NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. H. HERKEN
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT/M.

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

234. BAND

MIT 176 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958

Alle Rechte vorbehalten
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen
Springer-Verlag Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften

Inhaltsverzeichnis

Seite

Appel, W., s. Werle, E., und E. Happ

Balzer, H., s. Westermann, E., und J. Knell

Blank, J., s. Zlotowski, I.

Brehmer, Ch., und K. Feller, Ein Gerät zur Registrierung von Impulsfrequenzen. Mit 1 Textabbildung 544

Coper, H., H. Herken und W. Koransky, Die freien Nucleotide des Gehirns im generalisierten Krampfanfall. Mit 5 Textabbildungen 455

Credner, K., Stimulierung vegetativer Ganglien durch p-Brom-Benzyltrimethylammoniumbromid. Mit 4 Textabbildungen 303

Csornay, M., s. Gottsegen, G., und I. Szám

Decsi, L., s. Jéhes, J., F. Varga und S. Kovács

Dengler, H., und G. Reichel, Hemmung der Dopadecarboxylase durch α-Methyldopa in vivo. Mit 3 Textabbildungen 275

Droh, R., s. Taugner, R., U. Wagenmann, H. Hole, G. Grigoleit und J. Gillissen

Erdmann, W. D., s. Sakai, F., H. Dal Ri und G. Schmidt

Ervenius, O., B. Holmstedt und O. Wallén, Atropin- und Stramoniumzigaretten. Mit 1 Textabbildung 343

Feller, K., s. Brehmer, Ch.

Földes, I., s. Komlós, E.

Gebhard, J., F. Hohensee und T. Kusch, Über den Glutathiongehalt des Thymus von Ratten unter Einwirkung von Steroidhormonen. Mit 1 Textabbildung 439

Gillissen, J., s. Taugner, R., U. Wagenmann, H. Hole, G. Grigoleit und R. Droh

Görisch, V., Wirkungen von Atropinsulfat und Natriumdecylsulfonat auf isolierte Muskelpräparate. Mit 6 Textabbildungen 264

Gottsegen, G., I. Szám und M. Csornay, Wirkung des Methylenblau auf das experimentelle akute Lungenödem 126

Grigoleit, G., s. Taugner, R., H. Hole, G. Grigoleit und U. Wagenmann

—, s. Taugner, R., U. Wagenmann, H. Hole, R. Droh und J. Gillissen

Gutmann, E., s. Hudlická, O.

Habermann, E., Über das thrombinähnlich wirkende Prinzip von Jararacagift. Mit 4 Textabbildungen 291

Happ, E., s. Werle, E., und W. Appel

Härtefelder, G., G. Kuschinsky und K. H. Mosler, Über pharmakologische Wirkungen an elektrisch gereizten glatten Muskeln. Mit 6 Textabbildungen 66

—, —, —, Der Antagonismus verschiedener Sympatholytica gegenüber dem inhibitorischen Adrenalin- oder Noradrenalineffekt am elektrisch gereizten Meerschweinchenileum. Mi 7 Textabbildungen 91

Henatsch, H.-D., und F. J. Schulte, Einflüsse von Curare und Flaxedil auf die Muskelspindeln des Frosches. Mit 8 Textabbildungen 247

Herken, H., J. Natzschka und G. Senft, Die Wirkung elektrischer Reizungen im Zwischenhirn auf den Salz- und Wasserhaushalt. Mit 4 Textabbildungen 185

—, s. Coper, H., und W. Koransky

Seite

Hertting, G., und E. Stoklaska, Zur Beeinflussung des Formolödems der Rattenpfote durch nervöse und humorale Faktoren. Mit 3 Textabbildungen 390

Hohensee, F., s. Gebhard, J., und T. Kusch

Hole, H., s. Taugner, R., U. Wagenmann, G. Grigoleit, R. Droh und J. Gillissen

—, s. Taugner, R., G. Grigoleit und U. Wagenmann

Holmstedt, B., s. Ervenius, O., und O. Wallén

Hudlická, O., und E. Gutmann, Die Störungen des Energieumsatzes im normalen und im denervierten Muskel bei gedrosselter Durchblutung. Mit 4 Textabbildungen 501

Jacobi, H., W. Rummel und K. Pfleger, Die Beziehungen zwischen Phosphatdurchtritt und Glucoseresorption. Mit 4 Textabbildungen 404

—, s. Pfleger, K., und W. Rummel

—, s. Rummel, W., und K. Pfleger

Jahn, H., s. Sell, R., und E. Lindner

Knell, J., s. Westermann, E., und H. Balzer

Komlós, E., und I. Földes, Der Einfluß der Narkose auf die Wirkung von blutdrucksenkenden Mitteln auf den Gasstoffwechsel weißer Ratten. Mit 3 Textabbildungen 26

Koransky, W., Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns. Mit 10 Textabbildungen 46

—, s. Coper, H., und H. Herken

Kovács, S., s. Méhes, J., L. Decsi und F. Varga

—, s. Schneider, Gy., und J. Szöke

Kraft, H. G., Untersuchungen über die Blutdruckreaktion am Meerschweinchen nach verschiedenartiger Applikation von bronchospastisch wirkenden Substanzen. Mit 3 Textabbildungen 426

—, s. Meier, R.

Kramer, M., Aktivierung proteolytischer Fermente bei Entzündungsreaktionen 432

Kroneberg, G., und H. J. Schümann, Adrenalinsekretion und Adrenalinverarmung der Kaninchennebennieren nach Reserpin. Mit 1 Textabbildung 133

Kusch, T., s. Gebhard, J., und F. Hohensee

Kuschinsky, G., s. Härtfelder, G., und K. H. Mosler

Lechner, H., und F. Lembeck, Einfluß der Substanz P auf die elektrische Aktivität des Gehirns. Mit 3 Textabbildungen 419

Lembeck, F., s. Lechner, H.

Lenke, D., Narkosepotenzierende und analgetische Wirkung von 1,4-Dipyrrolidino-2-butin. Mit 3 Textabbildungen 35

Lindner, E., s. Sell, R., und H. Jahn

Maibauer, D., D. Neubert, und H. Rottka, Pharmakologische Untersuchungen bei der experimentellen Leberverfettung. Mit 4 Textabbildungen 474

Markwardt, F., Versuche zur pharmakologischen Charakterisierung des Hirudins. Mit 4 Textabbildungen 516

Mayer, Ch., und Ch. Stumpf, Die Physostigminwirkung auf die Hippocampus-Tätigkeit nach Septumläsionen. Mit 2 Textabbildungen. 490

Méhes, J., L. Decsi, F. Varga und S. Kovács, Selektive chemische Ausschaltung der Harnkanälchen I. Ordnung bei Kaninchen. Mit 4 Textabbildungen 548

Meier, R., und H.-G. Kraft, Die Bedeutung der vagalen Atemphasenregulation für die Wirkung bronchoconstrictorischer Pharmaka. Mit 5 Textabbildungen 1

Seite

Meier, R., und B. Schär, Ursächliche Bedingungen der durch Polysaccharide ausgelösten Leukocytenemigrationsförderung und chemotaktischen Reaktionen in Gewebekulturen. Mit 6 Textabbildungen 102

Mertz, D. P., Untersuchungen über den Einfluß pharmakologischer Substanzen auf den tubulären Transport von p-Aminohippursäure 220

Meyer, H. F., Pharmakologische Strukturanalysen am Rinderureter 378

Milković, S., s. Supek, Z., und B. Uroić

Mosler, K. H., s. Härtfelder, G., und G. Kuschinsky

Natzschka, J., s. Herken, H., und G. Senft

Neubert, D., s. Maibauer, D., und H. Rottka

Neuhold, K., Über die Leistungsreserve des hyperthermen Herzmuskels am Herz-Lungen-Präparat der Ratte 387

Ohnesorge, F. K., Über die Wirkung von Morphin und einigen zentralerregenden Stoffen auf den Miktionsreflex. Mit 8 Textabbildungen. . . . 311

Opitz, K., Über die glykogenbildende Wirkung von Glykolen 448

Palm, D., Über die Hemmung der Dopa-Decarboxylase durch Isonicotinsäurehydrazid. Mit 2 Textabbildungen 206

Pfleger, K., H. Jacobi und W. Rummel, Zur Frage der Bedeutung der Lactatakkumulation für die Glucoseresorption 400

—, s. Jacobi, H., und W. Rummel

—, s. Rummel, W., und H. Jacobi

Reichel, G., s. Dengler, H.

Repke, K., Ein neues Verfahren für die quantitative Bestimmung von Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen mit m-Dinitrobenzol. Mit 3 Textabbildungen 147

Ri, H. Dal, und K.-P. Schaefer, Pharmakologische Untersuchungen am artefiziellen Dauer-Nystagmus des Meerschweinchen. Mit 6 Textabbildungen 79

—, s. Sakai, F., W. D. Erdmann und G. Schmidt

Rottka, H., s. Maibauer, D., und D. Neubert

Rummel, W., K. Pfleger und H. Jacobi, Reaktivierung der Glucoseresorption. Mit 1 Textabbildung 414

—, s. Jacobi, H., und K. Pfleger

—, s. Pfleger, K., und H. Jacobi

Sakai, F., H. Dal Ri, W. D. Erdmann und G. Schmidt, Über die Atemlähmung durch Parathion oder Paraoxon und ihre antagonistische Beeinflußbarkeit. Mit 1 Textabbildung 210

Schaefer, K.-P., s. Ri, H. Dal

Schär, B., s. Meier, R.

Schmidt, G., s. Sakai, F., H. Dal Ri und W. D. Erdmann

Schneider, Gy, J. Szöke und S. Kovács, Kurze Mitteilung, Isolierung und Reindarstellung der Aristolochiasäure 566

Schöne, D., Darstellung und chemische Untersuchung toxischer Ricinfraktionen. Mit 4 Textabbildungen. 233

Schulte, F. J., s. Henatsch, H.-D.

Schümann, H. J., Über die Verteilung von Noradrenalin und Hydroxytyramin in sympathischen Nerven (Milznerven). Mit 6 Textabbildungen . . . 17

—, Über den Hydrytyramin- und Noradrenalingehalt der Lunge. Mit 4 Textabbildungen 282

—, s. Kroneberg, G.

Seite

Sell, R., E. Lindner und H. Jahn, Untersuchungen über die Anaesthesie der Dehnungs- und Berührungsreceptoren durch einige Lokalanaesthetica im Vergleich zur hustenstillenden Wirkung. Mit 5 Textabbildungen . . . 164

Senft, G., s. Herken, H., und J. Natzschka

Spurny, J., Der Einfluß der Semikastration auf Cyclus und Fertilität bei weißen Ratten 120

Stoklaska, E., s. Hertting, G.

Stumpf, Ch., s. Mayer, Ch.

Supek, Z., S. Milković und B. Uroić, Die Wirkung des Ferro-Ions auf die glatte Muskulatur in situ. Mit 3 Textabbildungen 373

Szám, I., s. Gottsegen, G., und M. Csornay

Szöke, J., s. Schneider, Gy., und S. Kovács

Taugner, R., H. Hole, G. Grigoleit und U. Wagenmann, Herstellung geeigneter Gefrierschnitte zur Autoradiographie der Niere in einer Kühlkammer mit eingebautem Mikrotom. Mit 2 Textabbildungen 330

—, und U. Wagenmann, unter Mitarbeit von H. Hole, G. Grigoleit, R. Droh und J. Gillissen, Serienmäßige Herstellung von Gefrierschnitt-Autoradiogrammen mit optimalem Kontakt. Mit 3 Textabbildungen . . 336

Uroić, B., s. Supek, Z., und S. Milković

Varga, F., s. Méhes, J., L. Decsi und S. Kovács

Wagenmann, U., s. Taugner, R., H. Hole und G. Grigoleit

—, s. Taugner, R., H. Hole, G. Grigoleit, R. Droh und J. Gillissen

Wallén, O., s. Ervenius, O., und B. Holmstedt

Werle, E., W. Appel und E. Happ, Über Hemmkörper für Trypsin und Kallikrein im Blut der Weinbergschnecke (Helix pomatia) und über eine Kreislauf-Schockwirkung des Schneckenblutes. Mit 7 Textabbildungen. . 364

Westermann, E., H. Balzer und J. Knell, Hemmung der Serotoninbildung durch α-Methyl-Dopa. Mit 3 Textabbildungen. 194

Wirth, W., Zur Wirkung System-insecticider Phosphorsäure-Ester im Warmblüter-Stoffwechsel. Mit 2 Textabbildungen. 352

Zlotowski, I., unter Mitwirkung von J. Blanck, Die Reduktion von Methämoglobin in der ultravioletbestrahlten Haut. Mit 7 Textabbildungen. . 530

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 1—16 (1958)

Aus den Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Die Bedeutung der vagalen Atemphasenregulation für die Wirkung bronchoconstrictorischer Pharmaka

Von
R. Meier und H.-G. Kraft

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Februar 1958)

Die Dauer der inspiratorischen und exspiratorischen Phase des Atemzuges ist zwangsläufig von den Änderungen der Dauer des Gesamtatemzuges abhängig, ihre relative Länge kann jedoch unabhängig davon geändert werden. Durch ausgedehnte Untersuchungen von Meier u. Bucher[5,8,22,27,28], die auf qualitative Beobachtungen von Head[16] zurückgehen, wurde gezeigt, daß die relative Länge der Atemphasen bei Verschluß der Atemwege vom absoluten Lungenvolumen durch Vermittlung des centripetalen Vagus bestimmt wird. Dies gilt für die physiologische Atmung und vor allem für die Atmung bei zwangsmäßig vergrößertem oder verkleinertem Lungenvolumen.

Vollständig ist eine komplexe Atemänderung nur durch Bestimmung aller an ihr beteiligten Teilfaktoren charakterisierbar. Viele der Teilfaktoren sind gekoppelt miteinander veränderbar, andere sind voneinander unabhängig und können in variierten Kombinationen auftreten. Es ist deshalb von besonderem Interesse, bei komplexen Atemwirkungen festzustellen, wie ein quantitativ erfaßbares, regulatorisches Prinzip wie z. B. die Verschlußphasenreaktion, bei ihnen geändert ist.

Eine derartige Analyse ist für Atemwirkungen verschiedensten Charakters aufschlußreich, so für atemdepressive Wirkungen, wie die durch Morphin, und atemerregende Wirkungen, wie die durch CO_2 und Coramin. In allen diesen Fällen gibt die Bestimmung der Verschlußreaktion Anhaltspunkte für die Beteiligung vagaler Einflüsse peripheren und centralen Charakters.

Eine analoge Untersuchung der bronchospastischen oder asthmatischen Reaktion schien deswegen von besonderem Interesse, weil erwogen wird, ob beim Asthma vagale Reaktionselemente eine Rolle spielen. Atemveränderungen, wie sie beim „Asthma bronchiale" vorliegen, bieten experimentell die Schwierigkeit, daß eine „bronchospastische" Wirkung, wenn wir diesen Ausdruck gebrauchen wollen, am narkotisierten Tier gut nur am Meerschweinchen mit den sonst wirksamen Stoffen wie Histamin,

Serotonin usw., sofern sie durch Aerosol zugeführt werden, erreicht werden kann.

Wir haben deshalb, um die vagalen Reaktionskomponenten bei dieser Reaktion zu untersuchen, am Meerschweinchen Stoffe von pharmakologisch verschiedenartigem Wirkungstypus geprüft, wie z. B. Histamin, Serotonin sowie Pilocarpin und Acetylcholin, von denen angenommen wird, daß sie eine „bronchospastische" oder „asthmaähnliche" Reaktion hervorrufen. Weiterhin wurde auch die Wirkung von Antagonisten zu diesen Stoffen untersucht.

Die Wirkung wird entsprechend vorstehender Überlegungen dadurch zu charakterisieren versucht, daß eine Reihe von für die Atmung charakteristischen Faktoren festgestellt wird, so das absolute Lungenvolumen, das Volumen des einzelnen Atemzuges, die inspiratorische und exspiratorische Endlage, die Mittellage der Atmung, die Atemfrequenz, die Dauer des einzelnen Atemzuges, die Dauer der inspiratorischen und exspiratorischen Phase und die entsprechenden inspiratorischen und exspiratorischen Verschlußphasen. Auf Grund dieser Daten sollte es möglich sein, die quantitative Relation der Atemänderungen zueinander und besonders hinsichtlich ihrer vagal determinierten Anteile zu ermitteln.

Methodik

Die Versuche wurden an etwa 300—400 g schweren männlichen Meerschweinchen in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.) durchgeführt. Es wurden neben nicht-vagotomierten auch beiderseits cervical vagotomierte Tiere verwendet.

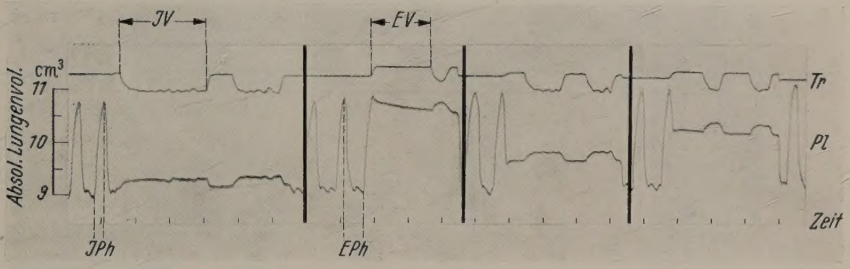
Die Tiere befanden sich während des Versuches in einem Ganzkörper-Plethysmographen und atmeten durch eine Trachealkanüle Außenluft. Die Testsubstanzen wurden entweder durch eine in die V. jugularis ext. eingebundene Kanüle oder mit Hilfe eines Aerosol-Gerätes (mit komprimierter Luft bei etwa 1,8 Atm.) durch die nach außen geführte Trachealkanüle appliziert. (Die überschüssige Spraymenge wurde gleichzeitig wieder abgesaugt. Eine durch Überdruck mögliche Überdehnung der Lungen wurde dadurch und durch einen Ausgleichsatemsack mit Ventil vermieden.)

Registriert wurden die Atembewegungen als Plethysmogramm über eine Marey-Kapsel und der Treachalseitendruck über ein Glasmembranmanometer[14] auf einen optischen Kymographen. Das absolute Lungenvolumen wurde aus Plethysmogramm und Trachealseitendruck pneumanometrisch errechnet (Bucher[6]).

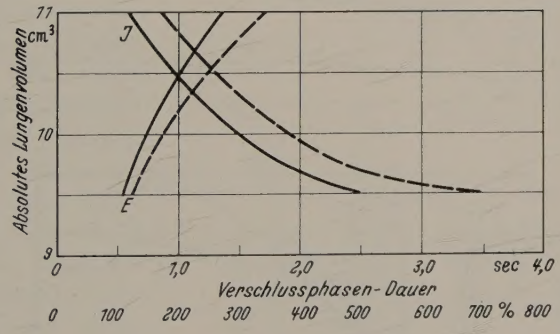
Die Bestimmung der Verschlußphasen wurde folgendermaßen durchgeführt: dem spontan atmenden Tier wurde i) nach erfolgter Ausatmung unmittelbar vor der Inspiration, ii) auf der Höhe der Inspiration unmittelbar vor Beginn der Exspiration und iii) bei zwei oder drei Intermediärstellungen die Trachea verschlossen und die Dauer des unter Verschluß auftretenden Atemzuges sowohl für die inspiratorische wie exspiratorische Phase bestimmt (Abb. 1a). Diese so erhaltenen Werte wurden quantitativ im absoluten Maß und in prozentualer Auswertung von der normalen Atemphase (= 100%) bestimmt und in Beziehung zum absoluten Lungenvolumen in ein Diagramm eingetragen (Abb. 1b). Diese Diagramme charakterisieren das Verhalten der untersuchten Tierart[7,10] und bedeuten, daß eine bestimmte Regulation dieser Beziehung unter den gegebenen Bedingungen vorliegt.

Versuchsergebnisse

Der *Histamin-Spray* wirkt beim Meerschweinchen in bezug auf die Atemveränderungen charakteristisch (Abb. 2a). Es kommt zu einer Abnahme des Atemzugsvolumens, zu einer leichten inspiratorischen Stellung der Atemmittellage, zur Frequenzzunahme und zur Abnahme der Atemphasen bei besonderer Betonung der inspiratorischen Atemphase.



a



b

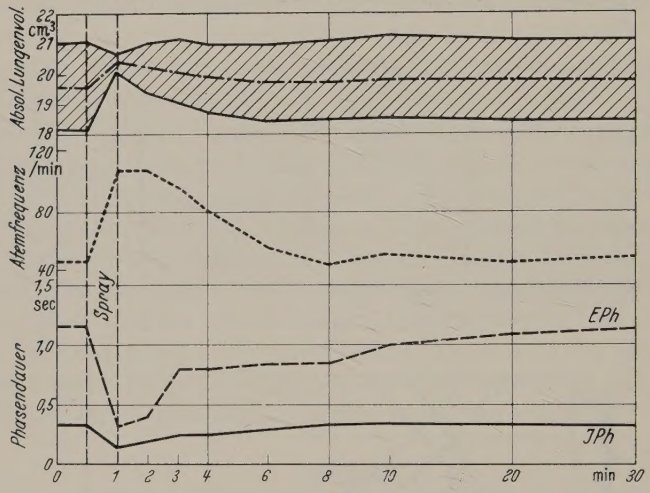
Abb. 1a. u. b. a Verhalten der inspiratorischen und exspiratorischen Trachealverschlußreaktionen am Meerschweinchen vor einer Inspiration, vor einer Exspiration und bei verschiedenen Intermediärstellungen. Von oben nach unten: Trachealseitendruck (*Tr*) mit inspiratorischen (*JV*) und exspiratorischen Verschlußreaktionen (*EV*); Plethysmogramm der Atembewegungen (*Pl*); *JPh* inspiratorische Atemphase, *EPh* exspiratorische Atemphase. Zeitschreibung: 1 sec. Urethan-Narkose. b Diagramm der ermittelten Werte für die Dauer der inspiratorischen (*J*) und exspiratorischen (*E*) Trachealverschlußreaktionen (Abszisse) in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen (Ordinate). Ausgezogene Kurven: Verschlußphasendauer in absoluten Werten; gestrichelte Kurven: Verschlußphasendauer in prozentualen Werten bezogen auf die normale Atemphasenlänge. Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.)

Die Bestimmung der Verschlußphasenreaktionen (Abb. 2b) zeigt, daß diese in charakteristischer Weise geändert werden: ganz besonders wird die expiratorische Verschlußphase verlängert in absoluten wie prozentualen Werten bezogen auf die normale Phasenlänge.

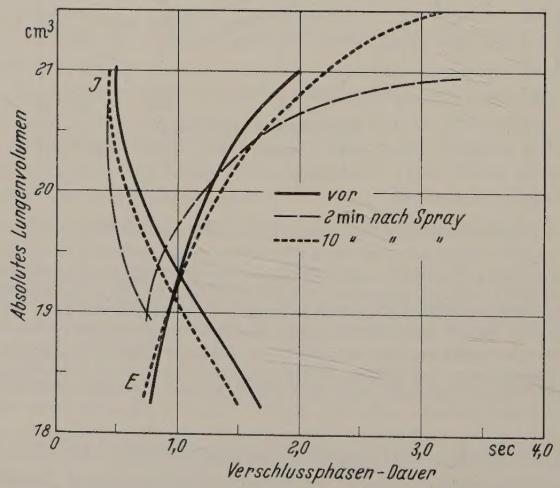
Der *Serotonin-Spray*-Effekt ist beim Meerschweinchen in vieler Hinsicht ähnlich wie die Wirkung des Histamin-Sprays (Tab. 1, S. 6). Er ist jedoch ausgesprochener, die Mittellage und Endlage sind noch weiter nach

inspiratorisch verschoben als beim Histamin. Die Charakteristiken sind sonst völlig die gleichen.

Die Verschlußphasenreaktion zeigt die gleichen Besonderheiten wie beim Histamin-Spray (Abb. 3a), auch hier ist vor allen Dingen die exspiratorische Phase verlängert (absolut wie prozentual). Diese



a



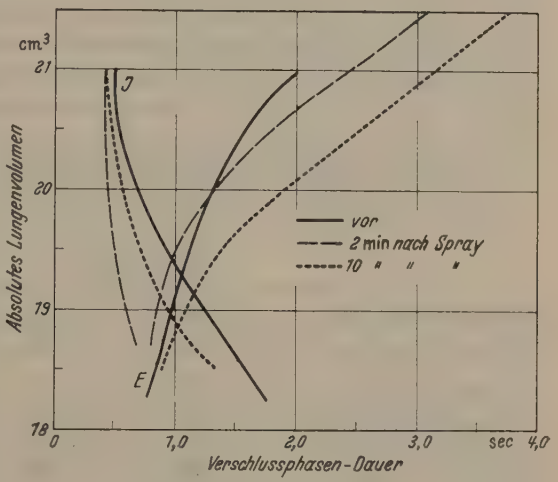
b

Abb. 2a u. b. a *Histamin-Spray* 2‰. Verhalten der Atemphasen, der Atemfrequenz und des absoluten Lungenvolumens unter einem Histamin-Spray. Mittelwerte von 6 Meerschweinchen unter Urethan-Narkose (1,5 g/kg s. c.). Abszisse: Zeit in Minuten nach dem Spray. *EPh* exspiratorische Phasendauer, *JPh* inspiratorische Phasendauer; b *Histamin-Spray* 2‰. Dauer der Trachealverschlußreaktionen in absoluten Werten (Abszisse) unter Histamin-Spray in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen (Ordinate). Mittelwerte von 6 Meerschweinchen, Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.). *J* inspiratorische Verschlußphasendauer, *E* exspiratorische Verschlußphasendauer. Spray-Dauer: 1 min

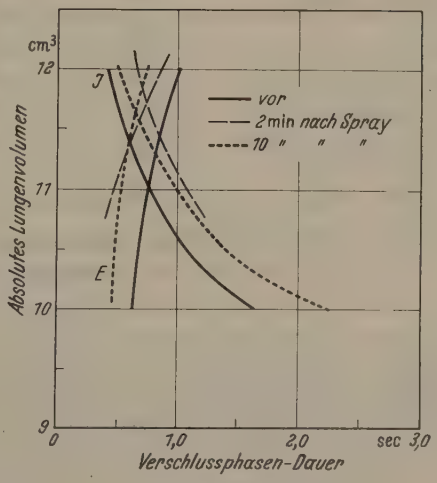
Verlängerung hält relativ lange an, auch wenn alle anderen Atemveränderungen schon abgeklungen sind.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Reaktionen des Meerschweinchens auf Histamin- und Serotonin-Spray verhalten sich die Verschlußphasenreaktionen bei der Anwendung eines *Acetylcholin-Sprays* anders. Formal sind die üblichen Abläufe, wie z. B. Abnahme des Atemzugsvolumens, inspiratorische Betonung der Atemmittellage, inspiratorische Zunahme des Lungenvolumens und deutliche Atemfrequenzsteigerung, die gleichen wie unter Histamin- bzw. Serotonin-Spray (Tab. 1), jedoch findet sich hier in absoluten Werten betrachtet eine Verkürzung der exspiratorischen Verschlußphase, bei Berechnung in prozentualen Werten ist sie verlängert (Abb. 3b).

Durch einen *Pilocarpin-Spray*, selbst bei lang anhaltender Spraydauer, konnte keine der unter Histamin- oder Serotonin-Spray zu beobachtenden Reaktionen am Meerschweinchen hervorgerufen werden.



a



b

Abb. 3a u. b. a *Serotonin-Spray 1%*. Dauer der Trachealverschlußreaktionen in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen unter einem Serotonin-Spray. Mittelwerte von 6 Meerschweinchen in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.). Spray-Dauer: 1 min; b *AcetylcholinSpray 1%*. Darstellung der absoluten Werte der Trachealverschlußreaktionen in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen unter einem Acetylcholin-Spray. Mittelwerte von 6 Meerschweinchen (Urethan-Narkose, 1,5 g/kg s.c.) Spray-Dauer: 1 min

Anders, als oben beschrieben, verhalten sich die Trachealverschlußreaktionen nach i.v. Applikation der gleichen Pharmaka: Nach *i.v. Gabe von Histamin oder Serotonin* kommt es zwar ebenfalls zu einer Verkleinerung des Atemzugsvolumens mit betont inspiratorischer Stellung der Atemmittellage und Zunahme des absoluten Lungenvolumens — obwohl die Abläufe flüchtiger sind als nach einem Histamin- oder Serotonin-Spray — (Tab. 1). Man findet die exspiratorischen Verschlußphasen bei

Tabelle 1. *Übersicht über die Wirkungsweise von „bronchospastischen" und anderen Substanzen auf die untersuchten Teilfaktoren der Atmung*

	Atem-Frequ.	*JPh*	*EPh*	*Absol. L. V.*	*Mittel-Lage*	*Az. Vol.*	*JV*	*EV*	*JV%*	*EV%*
Histamin-Spray 2‰	■	□	□	■	↑	□	□	■	□	■
Serotonin-Spray 1%	■	□	□	■	↑	□	□	■	□	■
Pilocarpin-Spray 5%	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Acetylcholin-Spray 1%	■	□	□	(■)	↑	□	□	□	(□)	■
Histamin 30 γ/kg i.v.	■	□	□	■	↑	□	□	□	□	■
Serotonin 30 γ/kg i.v.	■	□	□	■	↑	□	□	□	□	■
Pilocarpin 10 mg/kg i.v.	■	□	□	□	○	□	□	□	□	□
CO_2 10%	■	□	□	■	○	■	□	■	□	■
Coramin 50 mg/kg i.v.	■	□	□	■	↑	□	□	□	□	■
IPNA 30 γ/kg i.v.*	■	□	□	□	(○)	□	■	□	■	■
Novocain 10 mg/kg i.v.	■	□	□	□	(↑)	□	□	□	■	(■)
Veratrin 70 γ/kg i.v.	■	□	□	□	↓	□	□	■	■	■

* IPNA-Isopropyl-Noradrenalin ■ Zunahme □ Abnahme ○ kein Effekt ↑ Mittellage der Atmung nach inspiratorisch verlagert ↓ Mittellage der Atmung nach exspiratorisch verlagert

Atem-Frequ. Atemfrequenz, *JPh* inspiratorische Atemphase, *EPh* exspiratorische Atemphase, *Absol.L.V.* absolutes Lungenvolumen, *Mittel-Lage* Mittellage der Atmung, *Az.Vol.* Volumen des einzelnen Atemzuges, *JV* Dauer der inspiratorischen Verschlußphase, *EV* Dauer der exspiratorischen Verschlußphase, *JV%* bzw. *EV%* prozentualer Wert der Dauer der inspiratorischen bzw. exspiratorischen Verschlußphase bezogen auf die dementsprechenden Atemphasen

Darstellung in absoluten Werten verkürzt. Bei Auswertung der prozentualen Relation ergibt sich noch eine Verlängerung der exspiratorischen Verschlußphasen (Tab. 1).

Konnte durch einen Pilocarpin-Spray keine dem Histamin-, Serotonin- oder Acetylcholin-Spray ähnliche Reaktion erhalten werden, so gelang dies jedoch durch die i.v. Verabreichung von *Pilocarpin*. Nach

unseren Befunden kommt es dabei zu einer Verminderung des Atemzugsvolumens, aber bei gleichbleibender Atemmittellage zu keiner Zunahme des absoluten Lungenvolumens. Die Trachealverschlußreaktionen (Tab.1) zeichnen sich durch eine in absoluten wie in prozentualen Werten feststellbare Verkürzung der exspiratorischen Verschlußphase aus, d. h. einer gegensinnigen Reaktion wie bei Histamin oder Serotonin.

Die Befunde ergeben, daß bei genauer Analyse die sogenannten „bronchospastischen" Pharmaka verschiedene Wirkungen hervorbringen, und daß wahrscheinlich vagale Komponenten in ungleicher Weise bei ihnen vorhanden sind.

Diskussion

Voraussetzung für die Aufstellung einer Beziehung der beobachteten Phänomene ist die Kenntnis der Mechanismen der vagalen Atemsteuerung der untersuchten *Tierart*. Bucher zeigte[7,10], daß z. B. Katzen stärker inspiratorisch gesteuert sind als Kaninchen. Die vagale Atemsteuerung ist auch abhängig von der gewählten *Narkose*. Bei unseren mit Urethan narkotisierten Meerschweinchen fand sich bei normaler Atmung im Gegensatz zum Kaninchen eine betonte inspiratorische Verschlußreaktion, wohingegen Barbituratnarkosen (z. B. Dial, Numal, Narconumal) die exspiratorischen Verschlußreaktionen verlängerten. Es ist somit eindeutig, daß das Meerschweinchen eine für diese Tierart charakteristische Beziehung zwischen Lungenvolumen und Verschlußphase zeigt. Welche Bedeutung dieser besonders gearteten Reaktionsweise für die pharmakologischen Atemreaktionen des Meerschweinchens zukommt, ist vorläufig nicht entscheidbar. Für die Auswertung wurden nur die mit einer gleichen Narkose behandelten Tiere verwendet.

Die Interpretation unserer Versuchsresultate muß davon ausgehen, daß die Atemreaktion auf die verschiedenen „bronchoconstrictorischen" Pharmaka bei Aerosolanwendung teils gleichartig, teils different ist. Histamin und Serotonin rufen gleiche Atemveränderungen, Acetylcholin und Pilocarpin von ihnen und unter sich verschiedenartige Reaktionen hervor. Es ist somit wahrscheinlich, daß diese Effekte in qualitativer Hinsicht nicht gleichartig sind, auch wenn sie ähnliche Komponenten enthalten. Da wir den intratrachealen Widerstand, d. h. die Bronchokonstriktion, nicht direkt bestimmt haben, können wir nicht beurteilen, ob dieser „bronchoconstrictorische" Effekt bei den vier Stoffen verschieden ist. Wir müssen deshalb versuchen, aus indirekten Indizien das Reaktionsverhalten zu deuten. Bei Histamin und Serotonin tritt die Verlängerung der exspiratorischen Verschlußphase der Zunahme des Lungenvolumens gleichgerichtet ein, sie ist nur wesentlich ausgesprochener als für ein normales Lungenvolumen erwartet und bleibt

noch bestehen, wenn alle anderen Atemveränderungen bereits zurückgegangen sind.

Bei Acetylcholin ist die Verschlußphasenreaktion exspiratorisch, aber nur in Prozentual-Werten verstärkt, bei Pilocarpin ist keine solche vorhanden, trotzdem eine sonst analoge Atemreaktion auftritt. Es ist somit unzweifelhaft, daß Histamin und Serotonin einen besonderen Einfluß auf vagale Regulationskomponenten haben, die zwar in der Richtung, nicht aber in der Quantität der Lungenvolumenänderung entsprechen.

Es ist anzunehmen, daß diese Änderungen der exspiratorischen Verschlußphase ein besonderer Ausdruck des durch Histamin- oder Serotonin-Spray hervorgerufenen Atemeffektes beim Meerschweinchen sind und somit eine Charakteristik dieses Zustandes darstellen.

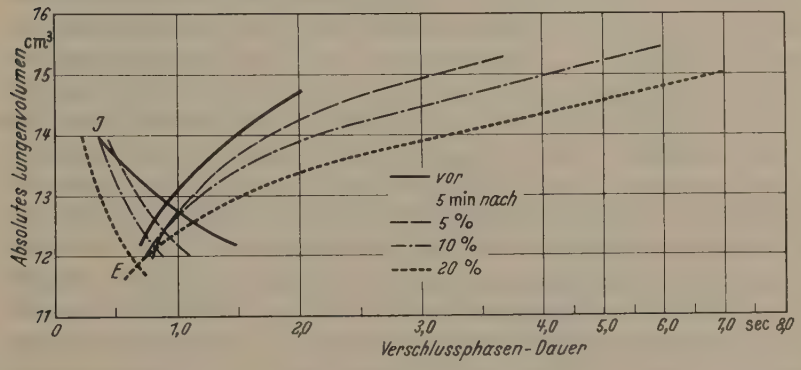
Eine der normalen Koppelung entsprechende Abhängigkeit der exspiratorischen Verschlußphasenreaktion von der Größe des absoluten Lungenvolumens scheint in diesen Fällen auch deswegen nicht vorzuliegen, weil die Verlängerung der exspiratorischen Verschlußphase nach Histamin- oder Serotonin-Spray erst kurze Zeit nach dem Spray voll einsetzt und auch dann noch zu beobachten ist, wenn bereits alle anderen Atemveränderungen, besonders die Vergrößerung des absoluten Lungenvolumens, wieder abgeklungen sind. Wäre diese Verschlußphasenverlängerung in physiologischer Weise volumenabhängig, so müßte sie viel rascher einsetzen und auch sofort wieder mit der Verminderung des absoluten Lungenvolumens verschwinden.

Die Relation dieser Reaktionen kann aus anderen pharmakologischen Wirkungen auf die Atmung des Meerschweinchens erschlossen werden, z. B. aus der *Kohlensäurewirkung* (Tab. 1). Diese zeichnet sich nämlich dadurch aus, daß eine Vergrößerung des einzelnen Atemzuges und eine leichte Frequenzsteigerung der Atmung bei gleichzeitiger leichter Verkürzung der Atemphasen stattfindet. Gleichzeitig ändern sich die Verschlußphasenreaktionen deutlich, und zwar betont die exspiratorische Verschlußphase (Abb. 4a). Den umgekehrten Effekt, d. h. eine Verkürzung der exspiratorischen Verschlußphase trotz zunehmendem absolutem Lungenvolumen (Beispiel der i.v. Applikation) kann man durch die i.v. Verabreichung von *Coramin* erreichen. Hier findet sich bei nur geringer Abnahme des Atemzugsvolumens eine Verschiebung der Atemmittellage zur inspiratorischen Seite hin; es kommt also zu einer Vergrößerung des absoluten Lungenvolumens bei gleichzeitiger Atemfrequenzsteigerung (Tab. 1). Aber es findet sich hier keine zu erwartende Verlängerung der exspiratorischen Verschlußphase, eher eine Verkürzung derselben bei gleichzeitiger Abnahme der inspiratorischen Phasendauer (Abb. 4b).

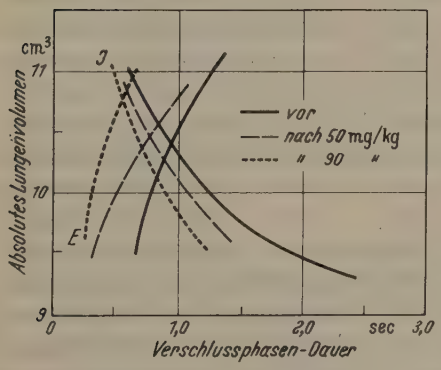
Diese Befunde zeigen, daß einerseits eine der physiologischen Reaktionsrichtung entsprechende Koppelung von Lungenvolumen und

Verschlußphasenreaktion auftreten (CO_2), andererseits Lungenvolumen und Verschlußphase gegensinnig durch ein Pharmakon beeinflußt werden kann, d. h. die Pharmakonwirkung kann die funktionelle Relation verstärken oder abschwächen.

Daß dieser Reaktionsablauf bei Histamin und Serotonin eng mit der vagalen Atemsteuerung verknüpft ist, läßt sich dadurch beweisen, daß



a



b

Abb. 4 a u. b. a *CO_2-Atmung.* Beeinflussung der absoluten Werte der Trachealverschlußreaktionen durch Atmung eines O_2-N_2-CO_2-Gasgemisches verschiedener CO_2-Konzentrationen in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen. Mittelwerte von 6 Meerschweinchen in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.); b *Coramin i.v.* Dauer der Trachealverschlußreaktionen in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen nach i.v. Verabreichung von Coramin. Mittelwerte von 6 Meerschweinchen (Urethan Narkose, 1,5 g/kg s.c.)

nach beiderseitiger Vagotomie selbst nach 10minutiger Spraydauer, d. h. einer 10mal längeren Zeit als am nicht-vagotomierten Tier weder die oben beschriebenen charakteristischen Trachealverschlußreaktionen noch die anderen Atemveränderungen ausgelöst werden können. Gleiche Befunde erhält man auch am nicht-narkotisierten, beiderseits vagotomierten Tier, das vor der Vagotomie bereits nach einer Minute mit schwerem Coma reagiert hatte. Dies kann jedoch auch mit dem bei Meerschweinchen nach Vagotomie sehr rasch auftretenden Lungenödem zusammenhängen.

Aus den oben geschilderten Versuchen ergibt sich weiter, daß die Wirkung von „bronchokonstriktorischen" Substanzen auf die Tracheal-

verschlußreaktionen abhängig von ihrer Applikationsart ist. Über die Ergebnisse einer i.v. Verabreichung von zum „Bronchospasmus" führenden Substanzen ist schon vielerorts berichtet worden, so z. B. durch Serotonin und zwar sowohl am Ganztier[1,13,15,19,29–32] als auch am isolierten Lungenpräparat[4], und auf der anderen Seite sind auch Ergebnisse über die Anwendung von Histamin- bzw. Serotonin-Aerosolen bekannt[12,17,18,26]. Diese Versuche wurden jedoch fast ausschließlich ohne Berücksichtigung der Trachealverschlußreaktionen durchgeführt. Ihre Charakterisierung hat zu erfolgen, wenn eine Beurteilung der vagalen Reaktionskomponente gesucht wird. Wir beobachteten, daß die gleiche Tierart bei Verabreichung der Substanzen Histamin und Serotonin, als Aerosol verabreicht, eine Verlängerung der exspiratorischen Verschlußphase und nach i.v. Applikation eine Verkürzung der exspiratorischen Verschlußphase zeigt, wenn man die Werte im absoluten Maßstab darstellt. Da die exspiratorische Verschlußphase nach Histamin- bzw. Serotonin-Spray unabhängig von der Atemfrequenz ist, würde sich die Nicht-Parallelität zwischen den absoluten und prozentualen Werten der exspiratorischen Verschlußphasenlänge nach i.v. Gabe der gleichen Substanzen durch die Annahme erklären lassen, daß in letzterem Falle eine zusätzliche Beeinflussung der Trachealverschlußreaktionen über andere Mechanismen erfolgt. Die zwar geringen Unterschiede zwischen dem absoluten und prozentualen Ausfall der exspiratorischen Verschlußphase nach einem Acetylcholin-Spray und die in absoluten wie prozentualen Werten sichtbare Verkürzung der exspiratorischen Verschlußphase nach Pilocarpin i.v. ließe sich dadurch erklären, daß es sich bei diesen „cholinergischen" Substanzen um einen primär andersartigen Wirkungstypus handelt.

Nach i.v. Verabreichung von Histamin oder Serotonin kommt es am beiderseits vagotomierten Tier trotz Ausfall der Trachealverschlußreaktionen noch zu einer zwar flüchtigen inspiratorischen Verschiebung der Atemmittellage, jedoch ohne Zunahme des absoluten Lungenvolumens; auch für die i.v. Wirkung ist somit der Vagus, allerdings in anderer Weise wie beim Spray, mitverantwortlich.

Eine weitere zu entscheidende Frage ist, inwieweit die „bronchoconstrictorische" Wirkung der Pharmaka für die Verschlußphasenregulation als Ursache in Betracht kommt. Auf Grund vorliegender Kenntnisse sollte diese allein über das Lungenvolumen wirken, aber es ist wohl nicht völlig ausgeschlossen, daß sie für sich einen Effekt ausübt.

Ihre Bedeutung für die Reaktion nach Anwendung eines Histamin- bzw. Serotonin-Sprays kann bis zu einem gewissen Grade dadurch erschlossen werden, daß die Effekte der Stenosierung der Atemwege durch andere Maßnahmen festgestellt werden. Untersucht man den Effekt einer Stenose außerhalb der Atemwege, so ergibt sich, daß bei dieser Stenoseart

sei sie nun inspiratorisch, exspiratorisch oder beidgerichtet, nach aufgesetzten Verschlußphasen in keiner Weise eine verstärkte Phasenreaktion auftritt, wie sie durch einen Histamin- oder Serotonin-Spray zustande kommt. Auch Stenosierungen der kleineren Bronchusäste mit Hilfe von Quarz- oder Kaolin-Staub-Inhalationen, über die kürzlich auch von Dautrebande, Delaunois u. Heymans[11] berichtet wurde, ergeben bei Verminderung des Atemzugsvolumens und Atemfrequenzsteigerung keine Verlängerung der exspiratorischen Trachealverschlußreaktionen, wie sie unter Histamin- bzw. Serotonin-Spray auftreten, sondern eine sowohl in absoluten wie in prozentualen Werten deutliche Verkürzung dieser Phasendauer. Sie ähneln somit eher den Reaktionen, wie sie nach Acetylcholin bzw. Pilocarpin-Gaben auftreten.

Es ergibt sich aus diesen Feststellungen, daß eine beliebige Stenose als solche keine ausschlaggebende Rolle für die Phasenreaktion spielen kann. Es bleibt aber immer noch möglich, daß die, wenn vorhandene, Stenose durch Histamin und Serotonin einen andersartigen Einfluß auf die Atmung hat als die bei den vorstehend besprochenen.

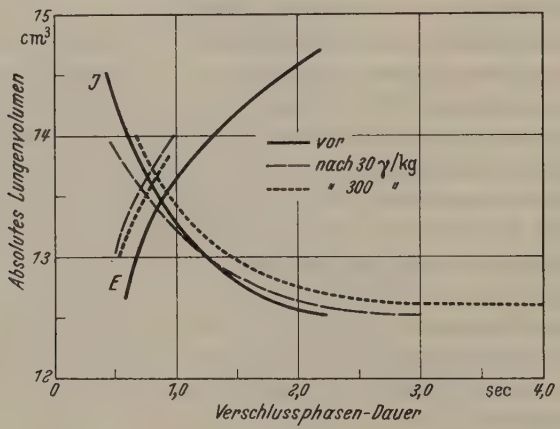
Auf Grund dieser Erwägungen muß angenommen werden, daß Histamin und Serotonin eine eigenartige, wohl hauptsächlich vagale Wirkung auf die Atmung und die Atemregulation besitzen. Ihre Ursache ist nicht vollständig geklärt. Pilocarpin und Acetylcholin weichen in ihrem Wirkungstypus ab.

Um weiteren Aufschluß über die Ursache der Histamin-Serotonin-Atemwirkung zu erhalten, wurde der Effekt von Antagonisten zu diesen Stoffen untersucht, so besonders das *Isopropyl-Noradrenalin*. Dieses ist nach Lockett[21] ein körpereigener Wirkstoff, nach Jaques, Bein u. Meier[18] von allen von ihnen untersuchten Verbindungen der wirksamste Serotonin-Antagonist am isolierten Rattencolon und auch im Sprayversuch am nicht-narkotisierten Meerschweinchen stark wirksam.

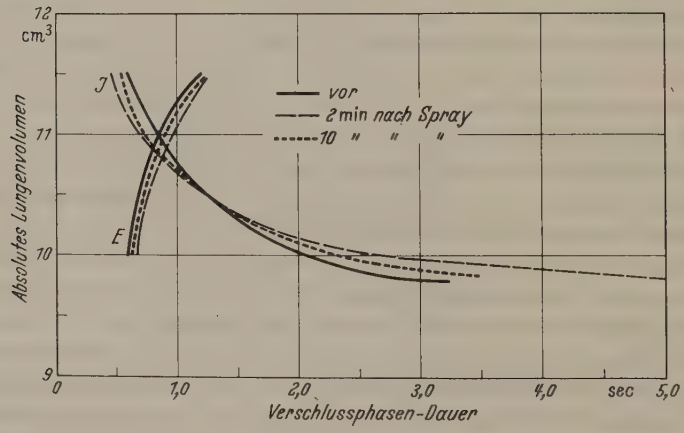
Die Wirkung des Isopropyl-Noradrenalin zeigt für viele Komponenten an der Atmung keine besonders charakteristischen Phänomene (Tab. 1). Trotzdem findet man eine ausgesprochene Veränderung der inspiratorischen Trachealverschlußreaktion (Abb. 5a), d. h. ein völlig inverses Verhalten zu der Wirkung des Histamin- oder Serotonin-Sprays. Da diese unter Isopropyl-Noradrenalin praktisch unabhängig von allen anderen Veränderungen der Atmung auftritt, muß in dieser Veränderung ein charakteristisches Zeichen der Wirkung des Isopropyl-Noradrenalin gesehen werden. Wurde nun vor einem Histamin- oder Serotonin-Spray Isopropyl-Noradrenalin (3,0 mg/kg s.c., 30 min vor dem Spray) gegeben, so hob Isopropyl-Noradrenalin die Wirkung des Histamins bzw. Serotonins völlig auf. Es traten zwar gewisse Veränderungen noch auf, z. B. bestand noch eine Atemfrequenzzunahme und Veränderungen des Atemzuges, aber die Mittellage blieb unverändert. Dabei ist die starke

Betonung der inspiratorischen Trachealverschlußreaktion, d. h. die Eigenwirkung des Isopropyl-Noradrenalins auch jetzt erhalten (Abb. 5 b).

Für die Interpretation des Mechanismus dieser Wirkung ist wichtig festzustellen, ob durch bestimmte atmungswirksame Pharmaka die Verschlußreaktionen, wie sie unter Histamin- bzw. Serotonin-Spray auftreten, geändert werden können. Es ist bekannt, daß Lungendehnungsreceptorenpotentiale durch Verabreichung von Lokalanaesthetica zeitweise



a



b

Abb. 5 a u. b. a *Isopropyl-Noradrenalin i. v.* Dauer der Trachealverschlußreaktionen in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen nach i.v. Verabreichung von Isopropyl-Noradrenalin. Mittelwerte von 6 Meerschweinchen in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.); b Trachealverschlußreaktionen in absoluten Werten in Abhängigkeit vom absoluten Lungenvolumen *unter einem Serotonin-Spray nach vorhergehender Verabreichung von Isopropyl-Noradrenalin* (3 mg/kg s.c., 30 min vor Spray-Beginn). Mittelwerte von 3 Meerschweinchen (Urethan-Narkose, 1,5 g/kg s.c.). Spray-Dauer: 1 min

zum Verschwinden gebracht werden können[3,9,20,23–25,33]. Andererseits weiß man, daß die Verabreichung von Veratrin eine entgegengesetzte Reaktion an den Lungendehnungsreceptoren hervorrufen kann (Meier, Bein u. Helmich[25], und andere[2,20,23,24,33]). In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten wir beobachten, daß die alleinige i.v. Gabe von Novocain am Meerschweinchen bei fast unveränderter Atemmittellage primär eine dosenabhängige Verlängerung, dann aber eine deutliche Verkürzung der exspiratorischen Verschlußreaktion ergibt (Tab. 1). Umgekehrte Verhältnisse finden sich nach i.v. Gaben von Veratrin am Meerschweinchen, da sich dort bei Neigung der Atemmittellage zur exspiratorischen Seite (also Verkleinerung des absoluten Lungenvolumens) die exspiratorischen Verschlußreaktionen zunehmend verlängern (Tab. 1). Verabreichten wir nun *10 mg/kg Novocain i.v. 2 min vor Spray-Beginn* mit Histamin oder Serotonin, so konnten wir beobachten, daß die formalen Abläufe, wie sie unter alleinigem Histamin- bzw. Serotonin-Spray auftraten, nicht beeinflußt wurden. Gegenüber diesen Befunden kam es aber jetzt zu einer deutlichen vorübergehenden Verkürzung der üblicherweise verlängerten exspiratorischen Verschlußphase. Die umgekehrten Verhältnisse konnten wir durch Verabreichung von *Veratrin* erhalten. Wurde sofort nach Beendigung des Histamin- oder Serotonin-Sprays Veratrin i.v. appliziert, so wurde auch hier der formale Ablauf nach dem Spray nicht wesentlich verändert. Aber es war nun stets eine zusätzliche Verlängerung der exspiratorischen Verschlußphase zu beobachten. Es wurde bereits bemerkt, daß Vagotomie die Wirkungen von Histamin und Serotonin zum Verschwinden bringt. Auch die Isopropyl-Noradrenalinwirkung wird durch diese Maßnahme aufgehoben. Alle Befunde sprechen somit dafür, daß eine vagal-reflektorische Komponente für diese Reaktion von Bedeutung ist.

Ihr Mechanismus kann auf Grund der vorliegenden Befunde nicht eindeutig festgelegt werden; die Untersuchung der Nervenaktionsströme verschiedener vagaler Fasern und die der für die Regulation in Frage kommenden Zentren können weiteren Aufschluß ermöglichen.

Alle erhobenen Befunde sprechen dafür, daß weder eine „Stenose" noch die Änderung der Größe des absoluten Lungenvolumens allein, wie sie bei einem Serotonin- oder Histamin-Spray zustande kommen, die Ursachen der eintretenden Atemveränderungen sein können. Unsere Untersuchung zeigt vielmehr, daß bei der Atemwirkung „bronchoconstrictorischer" Pharmaka und ihrer Antagonisten noch bisher unbekannte aber für sie offenbar charakteristische Wirkungskomponenten für die Auslösung der entstehenden Atemphänomene möglicherweise als wesentliche Komponenten in Betracht gezogen werden müssen. Diese Feststellung hat vielleicht auch für die Analyse der asthmatischen Reaktion Bedeutung.

Summary

The influence of histamine, serotonin, acetylcholine, and pilocarpine on various respiratory factors, such as lung volume, and respiratory rate, as well as on vagal respiratory regulation were studied in the guinea-pig by application of Head's tracheal occlusion reaction. The drugs investigated were administered in the form of aerosols and by the intravenous route.

The effect of histamine and serotonin sprays is marked by a decrease in respiratory volume, by inspiratory assumption of the middle position, and particularly by a distinct prolongation of the expiratory phase of tracheal occlusion. Intravenous doses of histamine or serotonin elicit these responses either not at all or to a lesser degree. Acetylcholine produces similar alterations, except that the reaction of the occlusion phase is different; pilocarpine exerts no analogous effect.

The alteration in the occlusion phases produced by histamine and serotonin, and the other changes in respiration, occur only if the vagi are intact, i.e. they are dependent upon vagal function. The occlusion phase reaction is not determined by the normal relation to the pulmonary volume.

Antagonists of histamine and serotonin, such as isopropyl-noradrenaline in particular, elicit an inverse respiratory effect, i.e. they prolong the inspiratory occlusion phases; they also abolish all the respiratory reactions induced by histamine and serotonin.

Local anaesthetics, which inhibit vagal impulses dependent on lung volume, as well as veratrine, which intensifies such impulses, have their usual effect on reactions provoked by histamine and serotonin.

The alteration in the occlusion phase reaction produced by histamine, serotonin, and isopropyl-noradrenaline is a characteristic feature of the effect of these drugs and affords evidence of an important vagal component in their action. Its significance with regard to the total reaction is discussed in the light of the present findings.

Literatur

[1] Balzer, H., H. Greeff u. E. Westermann: Die bronchokonstriktorische Wirkung des Serotonins. Klin. Wschr. **1956**, 1204.

[2] Bein, H. J.: Differenzierung afferenter autonomer Nervenbahnen mit Hilfe von Pharmaka. Helv. physiol. pharmacol. Acta **9**, C15 (1951).

[3] Bein, H. J., u. K. Bucher: Anaesthetische Wirkung an Lungendehnungsrezeptoren und anderen nervösen Substraten. (Zur Pharmakologie des Tessalon). Helv. physiol. pharmacol. Acta **15**, 55 (1957).

[4] Bhattacharya, B. K.: A pharmacological study on the effects of 5-hydroxytryptamine and its antagonists in the bronchial musculature. Arch. int. Pharmacodyn. **103**, 357 (1955).

[5] Bucher, K.: Über atmungsregulierende Systeme in der Pons. 2. Mitteilung. Pflügers Arch. ges. Physiol. **245**, 537 (1942).

[6] Bucher, K.: Fortlaufende Registrierung des Lungenvolumen am Kaninchen. Pflügers Arch. ges. Physiol. **246**, 307 (1942).

[7] Bucher, K.: Quantitativer Vergleich der vagal vermittelten Atemsteuerung bei Katze und Kaninchen. 21. Verh. Schweiz. Physiol. p. 17, Juni 1942.

[8] Bucher, K.:Ursache der Headschen Trachealverschlußreaktion. I. Mitteilung. Helv. physiol. pharmacol. Acta **5**, 147 (1947). — siehe auch: Jacot, C.: Etude du mécanisme du réflexe de Head au cours de l'expiration. II. Mitteilung. Helv. physiol. pharmacol. Acta 8, 517 (1950). — Lanz, U.: Zum Mechanismus der Headschen Trachealverschlußreaktion. III. Mitteilung. Helv. physiol. pharmacol. Acta **10**, 62 (1952).

[9] Bucher, K.: Analyse der Atmungswirkung des Diäthylamino-aethyl-tetrahydrofluoranthens. Helv. physiol. pharmacol. Acta **5**, 348 (1948).

[10] Bucher, K.: Vergleichende Charakterisierung der Lungenatmung einiger Säuger. Helv. physiol. pharmacol. Acta **7**, 470 (1949).

[11] Dautrebande, L., A. L. Delaunois et C. Heymans: Action neutralisante, protectrice et prophylactique d'aérosols pneumodilatateurs vis-a-vis d'aérosols pneumoconstricteurs (Substances pharmacologiques et poussières). Arch. int. Pharmacodyn. **110**, 361 (1957).

[12] Delaunois, A. L., L. Dautrebande and C. Heymans: Method for administering microcellular aerosols to guinea-pig isolated lungs. Arch. int. Pharmacodyn. **108**, 238 (1956).

[13] Douglas, W. W., and C. C. Toh: Respiration stimulant action of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the dog. J. Physiol. (Lond.) **120**, 311 (1953).

[14] Eichenberger, E.: Verbessertes Glasmembranmanometer für optische Registrierung. Helv. physiol. pharmacol. Acta **5**, 36 (1947).

[15] Erspamer, V.: Pharmacology of indolealkylamines. Pharmacol. Rev. **6**, 425 (1954).

[16] Head, H.: On the regulation of respiration. J. Physiol. (Lond.) **10**, 1, 279 (1889).

[17] Herxheimer, H. J.: The 5-hydroxytryptamine shock in the guinea-pig. J. Physiol. (Lond.) **128**, 435 (1955).

[18] Jaques, R., H. J. Bein and R. Meier: 5-hydroxytryptamine antagonists with special reference to the importance of sympathomimetic amines and isopropylnoradrenaline. Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, 269 (1956).

[19] Konzett, H.: The effects of 5-hydroxytryptamine and its antagonists in tidal air. Brit. J. Pharmacol. **11**, 289 (1956).

[20] Kreppel, E., u. H.F. Zipf: Eine vereinfachte elektrophysiologische Methode zum Nachweis endoanaesthetisch wirksamer Stoffe. Arch. int. Pharmacodyn. **101**, 279 (1955).

[21] Lockett, M. F.: A compound very closely resembling N-isopropyl-noradrenaline in saline extracts of cat adrenal gland. J. Physiol. (Lond.) **124**, 67 P (1954).

[22] Meier, R.: Über die Bedeutung des Lungenvolumens für die Atemveränderungen bei Ventilatmung unter einseitigem Verschluß des Atemweges. Helv. med. Acta **7**, Suppl. 6 (1940/41).

[23] Meier, R., u. H. J. Bein: Neuere Befunde über die organisationsspezifischen Wirkungen am autonomen Nervensystem. Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 6, 209 (1950).

[24] Meier, R., u. H. J. Bein: Hemmung vagaler Receptoren durch Fagarin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 119 (1952).

[25] Meier, R., H. J. Bein u. H. Helmich: Zur Wirkung des Veratrins auf die vagale Atemsteuerung. Experientia (Basel) **5**, 484 (1949).

[26] Meier, R., H. J. Bein u. H. G. Kraft: Zur Charakterisierung der durch 5-Hydroxytryptamin bedingten Atemreaktion. Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, 74C (1956).

[27] Meier, R., u. K. Bucher: Über atmungsregulierende Systeme in der Pons. 1. Mitteilung. Pflügers Arch. ges. Physiol. **245**, 412 (1941).
[28] Meier, R., u. K. Bucher: Über atmungsregulierende Systeme im Pons. 3. Mitteilung. Helv. physiol. pharmacol. Acta **2**, 35 (1944).
[29] Page, I. H.: Serotonin (5-hydroxytryptamine). Physiol. Rev. **34**, 563 (1954).
[30] Salmoiraghi, G. C., I. H. Page and I. W. McCubbin: Cardiovascular and respiratory response to intravenous serotonin in rats. J. Pharmacol. exp. Ther. **118**, 477 (1956).
[31] Schneider, J. A.: Species differences in respiratory and cardiovascular response to serotonine (5-hydroxytryptamine). Abstr. Montreal XIX. Int. Physiol. Congr. p. 738, **1953**.
[32] Schneider, J. A., and F. F. Yonkman: Action of serotonin (5-hydroxytryptamine) on vagal afferent impulses in the cat. Amer. J. Physiol. **174**, 127 (1953).
[33] Zipf, H. F., u. H. Miestereck: Über die intravenöse Wirkung verschiedener Lokalanaesthetica auf die Lungensensibilität. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **217**. 427 (1953).

Professor Dr. R. Meier, Forschungslaboratorium der Ciba AG.
Pharmaz. Abteilung, Basel/Schweiz

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 17—25 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die Verteilung von Noradrenalin und Hydroxytyramin in sympathischen Nerven (Milznerven)* **

Von

H. J. Schümann

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Januar 1958)

Rindermilznerven enthalten neben *Noradrenalin* fast gleichgroße Mengen Hydroxytyramin (Schümann 1956). In einer vor kurzem erschienenen Arbeit (Schümann 1958) konnte ich zeigen, daß das Noradrenalin der Milznerven in granulären, submikroskopischen Elementen gespeichert ist, die in der Ultrazentrifuge bei 12000—15000 × g sedimentieren —, ähnlich wie das Adrenalin und Noradrenalin des Nebennierenmarks in den „Adrenalin- und Noradrenalingranula" der chromaffinen Zellen (Blaschko u. Welch 1953; Hillarp, Lagerstedt u. Nilson; Schümann 1957). Wie die hormonhaltige Granula des *Nebennierenmarks* enthielten auch die noradrenalinhaltigen granulären Elemente der *sympathischen Nerven* (Milznerven) ATP-Mengen, die für die salzartige Bindung von je 4 Molekülen Brenzkatechinamin durch je 1 Molekül ATP ausgereicht hätten. Der molare Quotient Brenzkatechinamin/ATP wurde zu ungefähr 5 gefunden (Schümann 1958). Das Vorkommen von Hydroxytyramin in Milznerven ist durch v. Euler u. Lishajko bestätigt worden. In Rinder*lunge* fanden die Autoren Hydroxytyramin in noch höherem Maße als im Nerven am Brenzkatechinamingehalt beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob das *Hydroxytyramin* der Milznerven in gleicher Weise wie Noradrenalin in granulären Elementen gespeichert wird; ferner, ob auch im Milz*gewebe* — im Bereich der Endverästelungen der Nerven — nur Hydroxytyramin und Noradrenalin nachweisbar sind und, wie im Nerven selbst, sich kein Anhaltspunkt für das Vorkommen von *Adrenalin* findet; sodann, ob die von Holtz u. Westermann in sympathischen Nerven und Ganglien nachgewiesene *Dopadecarboxylase*, ähnlich wie im Nebennierenmark (Blaschko, Hagen, Welch), so auch im Milznerven sich nicht in corpusculären Elementen, sondern frei im Cytoplasma findet.

* Herrn Prof. Dr. W. Schulemann zum 70. Geburtstag.

** Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Methodik

Milznerven frisch geschlachteter Rinder wurden noch auf dem Schlachthof freipräpariert und unter Eiskühlung ins Laboratorium gebracht. Nach zweimaligem Waschen mit eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung wurden die Nerven mit der Schere zerkleinert und dann mit der fünffachen Menge kalter physiologischer Kochsalzlösung in einer Latapiemühle homogenisiert.

a) Sediment — Überstehende Lösung. In Vorversuchen wurde das Homogenat 20 min lang bei 0—2° C in der Spinco-Ultrazentrifuge mit 15000×g zentrifugiert. Das gröbere Gewebsreste und die granulären Zellelemente enthaltende Sediment wurde mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt, und die Suspension nochmals mit 15000×g zentrifugiert. Das „*Sediment*" wurde ebenso wie die vereinigten überstehenden Lösungen („Überstand") zur papierchromatographischen Bestimmung der Brenzkatechine aufgearbeitet.

b) Granula — Überstehende Lösung. In den Hauptversuchen wurde das Homogenat 15 min lang mit 800×g vorzentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand 15 min lang mit 12000×g zentrifugiert. Das jetzt erhaltene, von gröberen Gewebsbestandteilen freie, aus granulären Elementen bestehende Sediment wurde in NaCl-Lösung suspendiert und nochmals mit 12000×g zentrifugiert. Das Sediment („Granula") und die vereinigten überstehenden Lösungen („Überstand") wurden für die Papierchromatographie aufgearbeitet.

Papierchromatographische Bestimmung der Brenzkatechinamine. *a) „Sediment" und „Granula".* Die aus 100 g Milznerven erhaltenen Fraktionen wurden mit 50 ml salzsaurem Alkohol (1 ml konz. HCl auf 1000 ml Äthanol 96%) $^1/_2$ Std lang im Eisschrank extrahiert. Der beim Abnutschen erhaltene Rückstand wurde nochmals mit 20 ml HCl-Äthanol extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum bei 40—50° C fast bis zur Trockene gebracht, der Rückstand in 40 ml n-Butanol (mit n/10 HCl gesättigt) aufgenommen und das Filtrat 3mal mit je 15 ml n/200 HCl im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nach Vertreiben des Butanols im Vakuum wurde der saure wäßrige Extrakt mit 2 ml 10%iger Aluminiumsulfatlösung versetzt. Die Katecholamine wurden an das durch Zugabe von 0,5 n NaOH sich bildende Aluminiumhydroxyd bei p_H 7,6 adsorbiert. Der durch Zentrifugieren erhaltene Niederschlag wurde in 2—3 ml n-H_2SO_4 gelöst, das Aluminiumhydroxyd mit der 5fachen Volumenmenge Äthanol ausgefällt und in einem aliquoten Teil der Filtrate der Brenzkatechinamingehalt *colorimetrisch* nach der Methode von v. Euler u. Hamberg, bzw. *fluorimetrisch* nach v. Euler u. Floding bestimmt. Der Rest wurde im Vakuum eingedampft, und der Rückstand in 85%igem Äthanol-HCl aufgenommen, so daß 10—30 μg Noradrenalinäquivalente (colorimetrisch bzw. fluorimetrisch bestimmt) in 0,15 ml enthalten waren.

b) Der „*Überstand*" wurde mit dem 5fachen Volumen HCl-Äthanol versetzt und wie „Sediment" und „Granula" weiter aufgearbeitet. Zur Adsorption der Amine wurden 6 ml Aluminiumsulfat (10%ig) zu je 100 ml „Überstand" gegeben.

Papierchromatographie. Ascendierend in 85% Phenol + 15% n/10 HCl (M. Vogt); descendierend in n-Butanol/n HCl (Hamberg u. v. Euler 1950). 24° C, CO_2-Atmosphäre, Schl. & Sch. Nr. 2043b. Laufzeit 24—30 Std. Entfernung des Phenols durch Waschen der Chromatogramme mit Benzol. Anfärbung mit Kaliumferricyanid-Phosphatpuffer (James) und zusätzlich mit $FeCl^3$ 0,5% in 6,5%iger Phosphorsäure (Berliner-Blau-Reaktion nach Goldenberg, Faber, Alston u. Chargaff).

Dopadecarboxylase. Die aus einem Milznervenhomogenat 1:3 in 0,9%iger NaCl-Lösung gewonnene *Granulafraktion* wurde in m/15 Phosphatpuffer (p_H 6,5) aufgenommen; der *Überstand* wurde mit m/2 Phosphatpuffer auf p_H 6,5 gebracht. Es wurden Verdünnungen hergestellt, so daß 2 ml „Granulafraktion" 5,0 g Ausgangsgewebe, 2 ml „Überstand" 0,5 g Ausgangsgewebe entsprachen. — Versuchsansätze:

2 ml Granulaextrakt bzw. Überstand + 0,2 ml (25 μg) Pyridoxal-5-phosphat. — 0,4 ml (2 mg) l-Dopa. N_2-Atmosphäre. 37° C. Manometrische Bestimmung des abgespaltenen CO_2 in der Warburg-Apparatur.

Ergebnisse

1. Lokalisation von Hydroxytyramin und Noradrenalin in Rindermilznerven

a) Das in der Abb. 1 dargestellte Chromatogramm wurde mit dem durch Zentrifugieren des Nervenhomogenates (15000 × g) gewonnenen *Sediment* (*S*), das aus gröberen Gewebspartikeln und Granula besteht, und dem *Überstand* (*Ü*) erhalten. Aufgetragen wurden in beiden Fällen je 30 μg „Noradrenalinäquivalente" (fluorimetrisch bestimmt).

Testchromatogramm (*T*): je 10 μg Noradrenalin, Hydroxytyramin und Adrenalin.

Das Chromatogramm des *Sediments* (*S*) zeigt nur einen intensiv gefärbten Fleck, der dem R_f-Wert nach mit dem Noradrenalinfleck des Testchromatogramms übereinstimmt; daneben einen noch gerade sichtbaren in Hydroxytyramin-Höhe. Der „Noradrenalinfleck" färbte sich mit Kaliumferricyanid rot und gab im UV-Licht eine hellgrüne Fluorescenz wie das Noradrenalin des Testchromatogrammes. Der Überstand (*Ü*) gab zwei intensiv gefärbte Flecken mit den R_f-Werten des Noradrenalins und Hydroxytyramins des Testchromatogramms. Der „Hydroxytyraminfleck" färbte sich mit Kaliumferricyanid blaurot

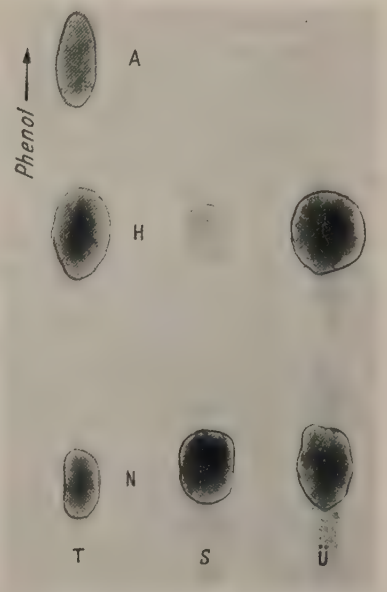


Abb. 1. *Papierchromatogramm: Milznervenhomogenat.* — *S* Sediment (Noradrenalin); *Ü* Überstand (Noradrenalin + Hydroxytyramin); *T* Testchromatogramm: je 10 μg Noradrenalin (*N*), Hydroxytyramin (*H*), Adrenalin (*A*). — Lösungsmittel Phenol-HCl, Laufzeit 30 Std, Entwicklung mit Kaliumferricyanid (siehe Text)

Abb. 2. Wie Abb. 1, jedoch Lösungsmittel n-Butanol-HCl, Laufzeit 24 Std, Entwicklung mit Kaliumferricyanid

und fluorescierte tief blauviolett wie das Hydroxytyramin des Testchromatogramms.

Adrenalin konnte wie in früheren Versuchen (Schümann 1956) mit Gesamtextrakten aus Milznerven nicht nachgewiesen werden, obwohl mit der Berliner-Blau-Reaktion 0,5 μg Adrenalin im Gemisch mit je 15 μg Noradrenalin und Hydroxytyramin einwandfrei nachweisbar war. Auch beim Auftragen von 100 μg Noradrenalinäquivalenten aus Milznervenextrakten ließ sich neben Noradrenalin nur Hydroxytyramin, nicht jedoch Adrenalin nachweisen.

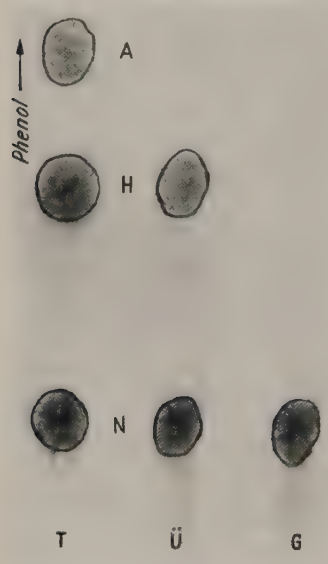


Abb. 3. *Papierchromatogramm: Milznervenhomogenat.* — *G* Granulafraktion (Noradrenalin); *Ü* Überstand (Noradrenalin + Hydroxytyramin). *T* Testchromatogramm: je 15 μg Noradrenalin (*N*), Hydroxytyramin (*H*), Adrenalin (*A*). Lösungsmittel Phenol-HCl, Laufzeit 29 Std, Entwicklung mit Kaliumferricyanid

Entwickelt man die Chromatogramme nicht mit Phenol-HCl, sondern mit *Butanol-HCl* als Lösungsmittel, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit des *Hydroxytyramins* größer als diejenige des Adrenalins. Auch unter diesen Bedingungen läßt sich im *Sediment* (*S*) nur Noradrenalin, im *Überstand* (*Ü*) daneben auch Hydroxytyramin nachweisen. Die Abb. 2 gibt ein Beispiel für 3 gleichartig ausgefallene Versuche. — Wiederum findet sich nicht der geringste Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Adrenalin.

b) Das in der Abb. 3 dargestellte Chromatogramm wurde mit der von gröberen Gewebspartikeln freien, reinen *Granula*fraktion der Nerven (*G*) und dem *Überstand* (*Ü*) erhalten (siehe Methodik). Aufgetragen wurden je 15 μg „Noradrenalinäquivalente" (fluorimetrisch bestimmt). Testchromatogramm (*T*): je 15 μg Noradrenalin, Hydroxytyramin, Adrenalin. Das Ergebnis: Die *Granula*fraktion (*G*) enthält nur Noradrenalin, der *Überstand* (*Ü*) daneben auch Hydroxytyramin. — *Adrenalin* läßt sich weder in der Granulafraktion noch im Überstand nachweisen, obwohl 0,5 μg sicher nachweisbar wären.

2. Hydroxytyramin im Milzgewebe

Das in der Abb. 4 dargestellte Chromatogramm wurde mit einem Teil eines Extraktes aus *Rindermilz* (0,3 ml) gewonnen, der auf Grund der fluorimetrischen Bestimmung 30 μg „Noradrenalinäquivalente" enthielt. Der Vergleich mit dem Testchromatogramm (je 15 μg Noradrenalin,

Hydroxytyramin, Adrenalin) ergibt, daß auch das Milz*gewebe* neben Noradrenalin *Hydroxytyramin* enthält, jedoch kein Adrenalin. Im Gegensatz zum Milz*nerven* enthält das Milz*gewebe* deutlich weniger Hydroxytyramin als Noradrenalin (Abb. 4); auf Grund der Farbintensität der Flecken des Chromatogramms ist Hydroxytyramin schätzungsweise nur zu einem Drittel bis einem Viertel am Gesamt-Brenzkatechinamingehalt beteiligt.

Der gleiche Extrakt wurde *colorimetrisch* bestimmt. Er enthielt 98 μg „Noradrenalinäquivalente" pro 1 ml. — Am *Katzenblutdruck* waren 0,2 ml des 15fach verdünnten Extraktes (1:15) so wirksam wie 1 μg Noradrenalin bzw. 3,5 μg Adrenalin bzw. 90 μg Hydroxytyramin (Abb. 5). Um die Wirksamkeit von 1 ml Originalextrakt zu erhalten, müssen die Werte mit 75 multipliziert werden. Es ergeben sich dann 75 μg „Noradrenalinäquivalente". — Die zwischen der *colorimetrischen* und *biologischen* Bestimmung bestehende Differenz — im ersten Fall 98 μg, im zweiten nur 75 μg „Noradrenalinäquivalente" — könnte ihre Erklärung in dem Hydroxytyramingehalt des Extraktes finden. In Übereinstimmung mit den Angaben Denglers wird bei der colorimetrischen Bestimmung von Noradrenalin (Oxydation durch Jod bei p_H 6) Hydroxytyramin zu 85% miterfaßt. Am Blutdruck bei einem Wirksamkeitsverhältnis Noradrenalin : Hydroxytyramin von 90 : 1 (vgl. Abb. 5) ist Hydroxytyramin praktisch nur zu 1% an der Wirkung beteiligt. Die Differenz von 23 μg Noradrenalinäquivalenten zwischen colorimetrischer Bestimmung (98 μg) und Auswertung am Blutdruck (75 μg) entspricht 27 μg Hydroxytyramin. Demnach bestehen die Katecholamine des Extraktes zu rund $^3/_4$ aus Noradrenalin und $^1/_4$ aus Hydroxytyramin, was sich auch aus dem Papierchromatogramm abschätzen ließ.

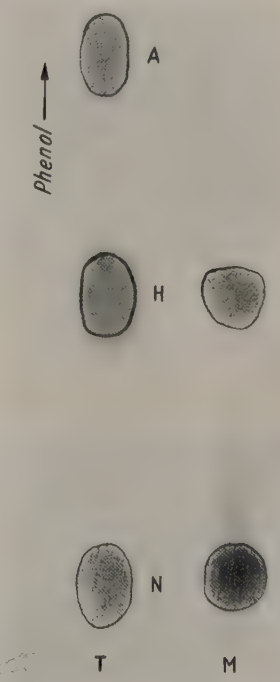


Abb. 4. *Papierchromatogramm: Milzextrakt* (*M*). *T* Testchromatogramm: je 15 μg Noradrenalin (*N*), Hydroxytyramin (*H*), Adrenalin (*A*). Lösungsmittel Phenol-HCl, Laufzeit 30 Std, Entwicklung mit Kaliumferricyanid (siehe Text)

Schließlich wurde der Milzextrakt am *Hühnercaecum* gegen Noradrenalin ausgetestet. *Blutdruck*äquivalente Mengen vom Extrakt (0,2 ml 1:15) und Noradrenalin (1 μg) — Abb. 5 — waren auch am Hühnercaecum praktisch gleich wirksam (Abb. 6). Eine Beimischung von 25% Hydroxytyramin in noradrenalinhaltigen Extrakten macht

sich am Blutdruck und Hühnercaecum nicht bemerkbar, da die „Ratio" Noradrenalin : Hydroxytyramin am Blutdruck mit 90 : 1 von derjenigen am Hühnercaecum (20 : 1) zu wenig verschieden ist.

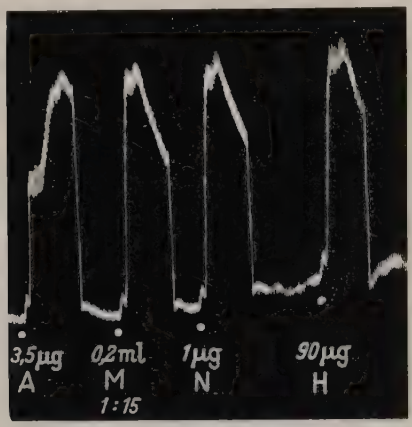


Abb. 5. *Auswertung eines Milzextraktes gegen Noradrenalin, Adrenalin und Hydroxytyramin am Blutdruck der Katze.* Katze 3,2 kg — Chloralosenarkose (80 mg/kg). — 1 Std vor Versuchsbeginn 1 mg/kg Atropin sulf., 1 mg/kg Hexamethoniumbromid und 2 mg/kg Vetren i.v. — *M* Milzextrakt; *N* Noradrenalin; *A* Adrenalin; *H* Hydroxytyramin (vgl. Text)

Demgegenüber müßte die Beimischung geringer Mengen von *Adrenalin* mit Hilfe dieser beiden Testobjekte nachweisbar sein; denn bei einer Ratio Adrenalin : Noradrenalin am Hühnercaecum von 35 : 1, wie sie im Versuch der Abb. 6 vorlag, und am Blutdruck von 0,28 : 1 (Abb. 5), genügt schon die Beimischung von nur 2% *Adrenalin* (0,02 µg auf 1 µg Noradrenalin), um die Wirkung blutdruckäquivalenter Mengen am Hühnercaecum zu verstärken (Abb. 6).

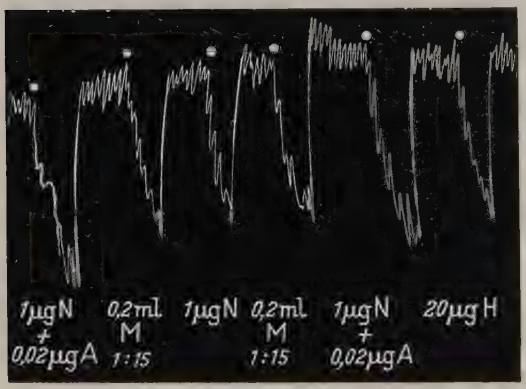


Abb. 6. *Vergleich blutdruckäquivalenter Mengen von Milzextrakt und Noradrenalin am Hühnercaecum.* 20 ml Tyrodelösung 28° C. *M* Milzextrakt; *N* Noradrenalin; *A* Adrenalin; *H* Hydroxytyramin

In weiteren 3 Versuchen mit Milzextrakten, in denen 100 bzw. 200 µg Noradrenalinäquivalente zur Chromatographie in Butanol-HCl aufgetragen wurden, ließ sich wiederum neben Noradrenalin 25—30% Hydroxytyramin nachweisen, jedoch kein Adrenalin. Die Chromatogramme wurden den R_f-Werten der Brenzkatechinamine entsprechend eluiert und der Amingehalt der Eluate colorimetrisch bzw. fluorimetrisch bestimmt. Hierbei wurden 60% der aufgetragenen Menge insgesamt wiedergefunden; 1,7—2,2% entfielen auf den dem R_f-Wert des Adrenalins entsprechenden Chromatogrammanteil. Im Eluat dieses Anteils ließ sich jedoch bei der Rechromatographie neben Noradrenalin nur eine sehr geringe Menge

Hydroxytyramin, kein Adrenalin nachweisen. Bei der Chromatographie mit Butanol-HCl als Lösungsmittel liegt der R_f-Wert des Adrenalins zwischen denjenigen des Noradrenalins und Hydroxytyramins. Das dürfte erklären, daß Spuren dieser beiden Amine auch in Höhe des R_f-Wertes des Adrenalins gefunden werden. Mit den von mir angewandten Methoden läßt sich demnach weder in Milznerven noch in Milzgewebe Adrenalin nachweisen.

3. Dopadecarboxylase

Vergleicht man die Dopadecarboxylase-Aktivität der *Granula*fraktion und des Überstandes, so ergibt sich, daß die *Granula*suspension — aus 5 g Milznerven gewonnen — auch nach Zugabe von Pyridoxal-5-phosphat als Coferment aus Dopa kein CO_2 abspaltet. Demgegenüber setzt der *„Überstand"* in einer nur 0,5 g Milznerven entsprechenden Menge in der gleichen Zeit 114 mm^3 CO_2 frei. Die Fermentaktivität ist demnach nicht an die noradrenalinhaltigen granulären Elemente der Milznerven gebunden, sie findet sich vielmehr ausschließlich im Überstand, d. h. im Cytoplasma. — Blaschko, Hagen u. Welch haben in Versuchen mit *Nebennierenmark* die Dopadecarboxylase auch nur im Cytoplasma, nicht in den chromaffinen Granula nachweisen können.

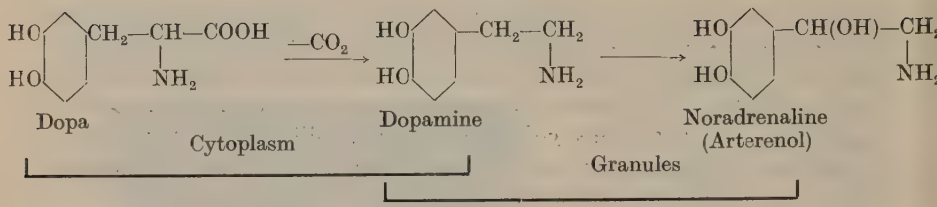
Summary

Homogenates of splenic nerves were divided into three fractions by differential centrifugation. The first fraction, consisting of the sediment odtained at 800 × g, and containing large cell particles, was discarded. The supernatant was centrifuged at 12000 × g. The sediment (fraction 2) contained the cell granules and the supernatant (fraction 3) the cytoplasm.

1. Sympathetic nerves (splenic nerves) are known to contain noradrenaline (v. Euler 1949), dopamine (hydroxytyramine) (Schümann 1956) and dopadecarboxylase (Holtz u. Westermann). In the present experiments *dopamine* and *dopadecarboxylase* were found in fraction 3 only, whereas *noradrenaline* could also be found in the cell granules of fraction 2. By paperchromatography only *noradrenaline* and *dopamine* but no *adrenaline* could be found in splenic nerves and spleen. The small amounts of *adrenaline* found by biological assay (v. Euler 1949) may be accounted for by the *dopamine*.

2. These results suggest

a) that the decarboxylation of dopa to dopamine occurs in the cytoplasm of the nerves. Apparently the dopamine then penetrates into the cell granules where it is oxydized to noradrenaline;



b) that sympathetic nerves contain exclusively "noradrenaline granules", whereas in the suprarenal medulla there are also "adrenaline granules" which methylate noradrenaline to adrenaline;

c) that noradrenaline is the only transmitter substance at the sympathetic nerve endings. There is no conclusive evidence for a role of adrenaline in sympathetic nervous transmission.

Following the suggestion of Holtz (1949) it would be preferable to speak of "noradrenergic" or "arterenergic" (Arterenol) instead of "adrenergic" innervation.

It has been suggested by Holtz u. Credner (1939; 1942) that the role of the dopadecarboxylase is not so much to form a pharmacologically active amine from a pharmacologically inactive amino acid, but rather to form the precursor for the biosynthesis of noradrenaline and adrenaline.

The *adrenal medulla* contains several *milligrams* of catechol amines per g. tissue, of which about 2% are dopamine (McGoodall; Dengler). In *splenic nerves* and spleen, however, dopamine accounts for 30—50% of the total catechol amine content which in these organs is only a few *micrograms* per g. The low amounts of transmitter substance contained in sympathetic nerves probably require a relatively high rate of synthesis. This would account for the high percentage of the precursor (dopamine) in nervous tissue.

Fräulein Christiane Bischof und Fräulein Frauke Hansen danke ich für ihre Mitarbeit.

Literatur

Blaschko, H., u. A. D. Welch: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 17 (1953).

Blaschko, H., P. Hagen and A. D. Welch: J. Physiol. (Lond.) **129**, 27 (1955).

Dengler, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 373 (1957).

Euler, U. S. v.: Acta physiol. scand. **19**, 207 (1949).

Euler, U. S. v., u. U. Hamberg: Acta physiol. scand. **19**, 74 (1949).

Euler, U. S. v., and J. Floding: Acta physiol. scand. **33**, suppl. **118**, 45 (1955).

Euler, U. S. v., and F. Lishajko: Acta physiol. pharmacol. neerl. **6**, 295 (1957).

Goldenberg, M., M. Faber, E. J. Alston and E. C. Chargaff: Science **1949**, 534.

Hamberg, U., and U. S. v. Euler: Acta chem scand. **4**, 1185 (1950).

Hillarp, N.-A., S. Lagerstedt u. B. Nilson: Acta physiol. scand. **28**, 251 (1953).

Holtz, P.: Naturwissenschaften **27**, 724 (1939).
Holtz, P.: Klin. Wschr. **1949**, 64.
Holtz, P., u. K. Credner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **200**, 356 (1942).
Holtz, P., u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 538 (1956).
James, W. O.: Nature (Lond.) **1948**, 851.
McGoodall, C.: Acta chem. scand. **4**, 550 (1950).
Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 566 (1956).
Schümann, H. J.: J. Physiol. (Lond.) **137**, 318 (1957).
Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 296 (1958).
Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 325 (1952).

Professor Dr. H. J. Schümann,
Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt am Main,
Ludwig-Rehn-Str. 14

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 26—34 (1958)

Aus der Pathophysiologischen Abteilung des „Korányi" Landesinstituts für Tuberkulose, Budapest

Der Einfluß der Narkose auf die Wirkung von blutdrucksenkenden Mitteln auf den Gasstoffwechsel weißer Ratten

Von

Endre Komlós und István Földes

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Dezember 1957)

Bei einer früheren Arbeit (E. Komlós u. I. Földes 1957), in welcher wir die Wirkung von Histamin und 48/80 auf den Gasstoffwechsel und die Körpertemperatur weißer Ratten verglichen, verwendeten wir auch nicht narkotisierte Tiere und kennzeichneten die Wirkung durch den Vergleich des O_2-Verbrauchs innerhalb je einer Stunde vor und nach der Arzneigabe. Nachdem wir festgestellt hatten, daß 48/80 bei einer Außentemperatur von 20°C den Grundstoffwechsel vermindert, versuchten wir die Histamindosis zu bestimmen, welche eine gleich große Grundumsatzsenkung verursacht. Dabei erhielten wir aber das überraschende und den Angaben der Literatur widersprechende Ergebnis, daß Histamin sogar in tödlichen Dosen keine nennenswerte Abnahme des O_2-Verbrauchs verursacht. Unsere experimentellen Bedingungen unterschieden sich von den in der Literatur angegebenen Methoden darin, daß wir das Histamin nicht s.c., sondern i.p. gaben, und daß unsere Ratten nicht narkotisiert waren. Unsere Resultate aber veränderten sich auch dann nicht, als wir das Histamin s.c. verabfolgten. Als wir jedoch unsere Tiere mit 0,8 g/kg Urethan leicht narkotisierten, kam sowohl bei i.p., als auch bei s.c. gegebenem Histamin die in der Literatur beschriebene Senkung des O_2-Verbrauchs zustande.

Die Bestimmung des O_2-Verbrauchs in je 10 min-Perioden ergab aber später, daß Histamin den O_2-Verbrauch auch der nicht narkotisierten Tiere bei 20°C senkte. Diese Wirkung ist aber bedeutend kleiner und von kürzerer Dauer als die der gleichen Dosis bei narkotisierten Tieren. In den vorliegenden Versuchen haben wir diese Wirkung analysiert und auch andere blutdrucksenkende Pharmaka untersucht.

Methodik

In unseren Versuchen verwendeten wir 150—300 g schwere, in unserem Institut gezüchtete weiße Ratten beiderlei Geschlechts, die zum Teil mit 0,8 g/kg Urethan s.c. leicht narkotisiert waren. Der Gasstoffwechsel wurde in 10 min-Perioden mit

Hilfe des von Issekutz-Issekutz jr. (1942) konstruierten Stoffwechselapparates gemessen. Die Temperatur des Wasserbades betrug 20—30° C. Nachdem wir in 6—8, bei wachen Tieren in 10—12 Perioden den Grundumsatz bestimmt hatten, hoben wir den Apparat aus dem Wasserbad heraus und injizierten die zu untersuchende Lösung i.p., worauf wir den Apparat wieder in das Wasserbad stellten. Das nahm bei einem Tier höchstens 2 min in Anspruch. Der Wert der ersten 10 min-Periode wurde verworfen. Der O_2-Verbrauch in Milliliter wurde auf 100 cm² Körperoberfläche bezogen. In den Tabellen und Abbildungen sind immer die Mittelwerte von je 10 Tieren dargestellt.

Ergebnisse

Versuche mit Histamin. Wir verwendeten zu unseren Versuchen immer dieselbe Histamindosis, nämlich 80,0 mg/kg i.p. Aus der Tab. 1 und Abb. 1 ist ersichtlich, daß sich der O_2-Verbrauch sowohl der wachen als auch der narkotisierten Ratten als Wirkung der Histaminverabfolgung bei 30 °C Außentemperatur signifikant erhöhte. In der ersten Stunde nach der Injektion verbrauchten die wachen Tiere 22,2 ± 4,6 ml, die narkotisierten Tiere 26,6 ± 4,2 ml mehr O_2 als in der Stunde vor der Injektion. Bei 20 °C (Tab. 2) besteht ein viel größerer Unterschied zwischen den beiden Gruppen: der O_2-Verbrauch der narkotisierten Tiere ist um 25,6 ± 8,5 ml geringer in der ersten Stunde nach der Histamingabe, als in derselben Periode vor der Injektion, während bei wachen Tieren die Verminderung nur 1,1 ± 16,6 ml beträgt. Die Verminderung des O_2-Verbrauchs besteht bei den narkotisierten Tieren auch noch in der 90. min. nach der Injektion, ihr Maximum beträgt um 34%; bei den wachen Tieren ist sie nur von kurzer Dauer, ihr Maximum beträgt um 18% und in der 30. min nach der Injektion erreicht sie das Ausgangsniveau. Die Verminderung des O_2-Verbrauchs war in 70—80 min nach der Histamininjektion 11 mal größer bei den narkotisierten als bei den wachen Tieren.

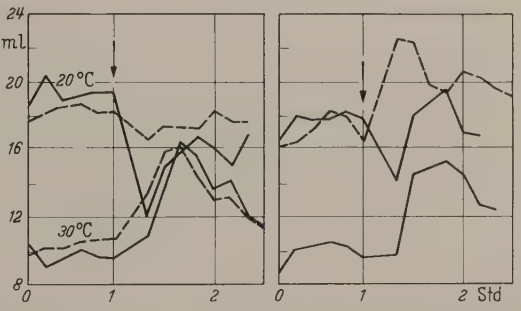


Abb. 1. Die Wirkung von Histamin auf Sauerstoffverbrauch bei 20 und 30° C. Durchschnittsergebnisse von je 10 Rattenversuchen. O_2-Verbrauch während 10 min auf 100 cm² Körperoberfläche. Links narkotisierte, rechts wache Tiere.
——— Die Wirkung von 80,0 mg/kg Histamin i.p.
— — — Die Wirkung von 80,0 mg/kg Histamin i.p. unter Antihistaminschutz

Da wir in früheren Versuchen ebenso wie andere Autoren (L. Gyermek u. Gy. Pataky 1951) festgestellt hatten, daß Antihistaminica die den O_2-Verbrauch steigernde Wirkung des Histamins bei 30 °C nicht beeinflussen, haben wir diese Frage in den vorliegenden Experimenten

Tabelle 1. *Wirkung blutdrucksenkender Mittel*

Zahl der Versuchstiere	Verabreichte Mittel mg/kg i.p.	O_2-Verbrauch bei narkotisierten Tieren vor Injektion 1. Std	O_2-Verbrauch bei narkotisierten Tieren nach Injektion 1. Std	Unterschied in Milliliter	Unterschied in Prozent
1.	2.	3.	4.	5.	6.
10—10	Histamin 80,0 mg/kg	70,0 ± 5,4	96,6 ± 6,4	+ 26,6 ± 4,2	+ 38,0
		$t = 20{,}461$; $p < 0{,}001$			
10	Histamin 80,0 mg/kg	74,1 ± 3,1	98,2 ± 6,5	+ 24,1 ± 8,8	+ 32,5
		$t = 8{,}607$; $p < 0{,}001$			
10—10	Doryl 0,2 mg/kg	70,9 ± 4,4	87,1 ± 4,5	+16,2 ± 2,6	+ 22,8
		$t = 20{,}122$; $p < 0{,}001$			
10—10	Doryl 0,2 mg/kg	77,1 ± 6,4	88,9 ± 5,0	+11,8 ± 5,6	+ 15,3
		$t = 6{,}629$; $p < 0{,}001$			
10—10	Papaverin 4,0 mg/kg	82,8 ± 2,9	84,2 ± 8,2	+ 1,4 ± 7,1	+ 1,5
		$t = 0{,}646$; $0{,}6 > p > 0{,}5$			

nicht untersucht. Bei 20 °C besteht aber ein deutlicher Unterschied in der Höhe des O_2-Verbrauchs zwischen wachen und narkotisierten Ratten nach Vorbehandlung mit 10,0 mg/kg Synopen. Wir verabfolgten die Synopen-Lösung i.p., bestimmten den Grundumsatz und injizierten 10 min später Histamin. Unter dem Antihistaminschutz bewirkte Histamin bei narkotisierten Tieren in einer Stunde eine Verminderung des O_2-Verbrauchs von insgesamt 5,6 ml, im Gegensatz zur Verminderung von 25,6 ml bei Tieren ohne Antihistaminschutz. Der O_2-Verbrauch der nicht narkotisierten und mit Synopen vorbehandelten Tiere verminderte sich durch die Histamininjektion nicht, sondern nahm um 22,9 ml zu. Histamin steigert also bei 20 °C den O_2-Verbrauch von wachen Tieren nach Vorbehandlung mit Synopen ebenso wie ohne Antihistaminschutz bei 30 °C, während die Vorbehandlung mit Synopen die Verminderung des O_2-Verbrauchs narkotisierter Tiere bei 20 °C bedeutend hemmt.

Versuche mit Doryl. Da es trotz vieler Untersuchungen nicht gelang, den Mechanismus der Wirkung von Histamin auf den O_2-Verbrauch befriedigend zu klären (H. H. Dale u. P. P. Laidlaw 1911—1912, M. Jancsó 1947, B. Issekutz jr., I. Lichtneckert u. H. Nagy 1953, L. Gyermek 1950, F. Herr u. J. Pórszász 1951), untersuchten wir, ob andere blutdrucksenkende Pharmaka den O_2-Verbrauch weißer Ratten beeinflussen können und auf welcher Weise. Doryl, das die

auf den O_2-Verbrauch von Ratten bei 30° C

(ml/100 cm²/Std) bei 30° C					
bei nicht narkotisierten Tieren					
vor	nach	Unterschied		Bemerkung	Statistische Auswertung des Unterschiedes der 5. und 9. Rubrik
Injektion		in Milliliter	in Prozent		
1. Std	1. Std				
7.	8.	9.	10.	11.	
71,6 ± 1,7	93,8 ± 5,0	+ 22,2 ± 4,6	+ 31,0		$t = 2{,}236$ $p < 0{,}05$
$t = 14{,}800$; $p < 0{,}001$					
				Anti-histamin-schutz	
73,7 ± 5,7	85,3 ± 4,9	+ 11,6 ± 2,9	+ 15,7		$t = 3{,}509$ $0{,}01 > p > 0{,}001$
$t = 6{,}043$; $p < 0{,}001$					
82,7 ± 3,6	91,6 ± 10,2	+8,9 ± 10,4	+ 10,7	Atropin-schutz	$t = 0{,}760$ $0{,}5 > p > 0{,}4$
$t = 2{,}697$; $0{,}05 > p > 0{,}02$					
78,1 ± 5,2	79,8 ± 11,6	+ 1,7 ± 11,4	+ 2,2		$p < 0{,}9$
$t = 0{,}485$; $0{,}7 > p > 0{,}6$					

Rectaltemperatur vermindert (M. Fabinyi, J. Szebehelyi 1948), senkte in einer Dosis von 0,2 mg/kg i.p. ebenso wie Histamin den O_2-Verbrauch der Tiere bei 20° C, erhöhte ihn hingegen bei 30° C (Tab. 1, 2 und Abb. 2). Bei 30° C verbrauchten die narkotisierten Ratten 16,2 ml, die wachen Tiere 11,6 ml mehr O_2 innerhalb einer Stunde nach der Injektion, als während derselben Zeit vor der Injektion. Bei 20° C jedoch verbrauchten die narkotisierten Tiere in gleichem Zeitraum nach der Injektion durchschnittlich 38,3 ml, die wachen 3,0 ml weniger O_2, als vor der Injektion. Die maximale Senkung der wachen Gruppe betrug um 26% und erreichte das Ausgangsniveau in der 30. min nach der Injektion, während die maximale Senkung der narkotisierten Tiere um 47% betrug und die Ausgangswerte erst in der 130. min erreichte.

Wir hatten gewisse Schwierigkeiten bei Untersuchung der Frage, wie die Vorbehandlung mit Atropin die Wirkungen des Doryls auf den O_2-Verbrauch beeinflußt? Bei diesen Versuchen wurde 12,5 mg/kg Atropin i.p. 15 min vor der Dorylverabfolgung gegeben. Diese Atropindosis steigert schon an sich den O_2-Verbrauch wacher Tiere: innerhalb einer Stunde nach der Injektion nahm der O_2-Verbrauch bei 20° C um 7,0 ml und bei 30° C um 11,4 ml zu. Diese Wirkung ist wahrscheinlich auf die Motilitätssteigerung zurückzuführen, da die gleiche Dosis Atropin keine Wirkung auf den O_2-Verbrauch narkotisierter Tiere hatte.

Tabelle 2. *Wirkung blutdrucksenkender Mittel*

Zahl der Versuchstiere	Verabreichte Mittel mg/kg i.p.	O_2-Verbrauch bei narkotisierten Tieren vor Injektion 1. Std	O_2-Verbrauch bei narkotisierten Tieren nach Injektion 1. Std	Unterschied in Milliliter	Unterschied in Prozent
1.	2.	3.	4.	5.	6.
10—10	Histamin 80,0 mg/kg	127,9 ± 10,1	102,3 ± 7,3	— 25,6 ± 8,5	— 20,0
		$t = 9{,}481$; $p < 0{,}001$			
10—10	Histamin 80,0 mg/kg	121,7 ± 11,1	116,1 ± 11,1	— 5,6 ± 9,8	— 4,6
		$t = 1{,}806$; $0{,}2 > p > 0{,}1$			
10—10	Doryl 0,2 mg/kg	124,1 ± 12,5	85,8 ± 20,0	—38,3±10,7	— 30,8
		$t = 11{,}264$; $p < 0{,}001$			
10—10	Doryl 0,2 mg/kg	124,3 ± 13,3	117,0 ± 15,9	— 7,3 ± 8,3	— 5,9
		$t = 2{,}423$; $0{,}05 > p > 0{,}02$			
10—10	Papaverin 4,0 mg/kg	125,0 ± 10,2	104,1 ± 9,5	—20,9 ± 5,4	— 16,7
		$t = 7{,}129$; $p < 0{,}001$			

Bei 30° C verbrauchten die narkotisierten Tiere nach Vorbehandlung mit Atropin innerhalb einer Stunde nach der Dorylinjektion 11,8 ml mehr O_2 als während der gleichen Periode vor der Injektion, während

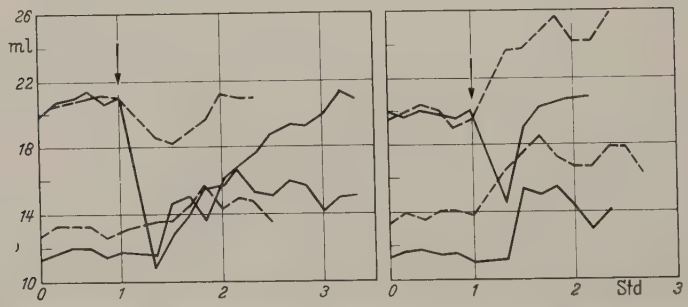


Abb. 2. Die Wirkung von Doryl auf Sauerstoffverbrauch bei 20 und 30° C. Durchschnittsergebnisse von je 10 Rattenversuchen. O_2-Verbrauch während 10 min auf 100 cm² Körperoberfläche. Links narkotisierte, rechts wache Tiere. —— Die Wirkung von 0,2 mg/kg Doryl i.p. — — — Die Wirkung von 0,2 mg/kg Doryl i.p. unter Atropinschutz

die wachen Tiere 20,3 ml mehr verbrauchten. Von diesem Wert müssen wir aber die Atropinwirkung abrechnen; es bleibt dann eine Zunahme des O_2-Verbrauchs von 8,9 ml. Bei 20° C verbrauchten die narkotisierten Ratten in einer Stunde nach der Injektion 7,3 ml O_2 weniger, die wachen

auf den O_2-Verbrauch von Ratten bei 20° C

(ml/100 cm²/Std) bei 20° bei nicht narkotisierten Tieren vor Injektion 1. Std	nach 1. Std	Unterschied in Milliliter	Unterschied in Prozent	Bemerkung	Statistische Auswertung des Unterschiedes der 5. und 9. Rubrik
7.	8.	9.	10.	11.	
118,3 ± 14,1	117,2 ± 14,6	— 1,1 ± 16,6	— 0,9		$t = 4{,}150$ $p < 0{,}001$
$t = 0{,}211$; $0{,}9 > p > 0{,}8$					
114,7 ± 14,6	137,6 ± 8,1	+ 22,9 ± 9,2	+ 19,4	Anti-histamin-schutz	$t = 6{,}708$ $p < 0{,}001$
$t = 7{,}895$; $p < 0{,}001$					
118,9 ± 10,0	115,9 ± 11,8	— 3,0 ± 10,7	— 2,5		$t = 7{,}378$ $p < 0{,}001$
$t = 0{,}133$; $0{,}9 > p > 0{,}8$					
118,3 ± 8,4	138,8 ± 19,2	+20,5± 15,9	+ 17,3	Atropin-schutz	$t = 4{,}896$ $p < 0{,}001$
$t = 4{,}100$; $0{,}01 > p > 0{,}01$					
116,1 ± 8,2	102,0 ± 7,2	— 14,1 ± 8,3	— 12,0		$t = 2{,}159$ $0{,}05 > p > 0{,}02$
$t = 5{,}109$; $p < 0{,}001$					

Tiere 27,5 ml mehr als in der entsprechenden Zeitspanne der Grundumsatzbestimmung. Wenn wir von diesem die durch Atropin verursachte Zunahme des O_2-Verbrauchs abrechnen, bleibt noch eine Zunahme von 20,5 ml. Bei 20° C ändert sich also die Wirkung des Doryls auf den Gasstoffwechsel nach Vorbehandlung mit Atropin ebenso, wie die des Histamins nach Vorbehandlung mit Synopen: bei narkotisierten Tieren wird die Verminderung des O_2-Verbrauchs unter Atropinschutz viel geringer und bei wachen Tieren findet man statt Verminderung eine Zunahme.

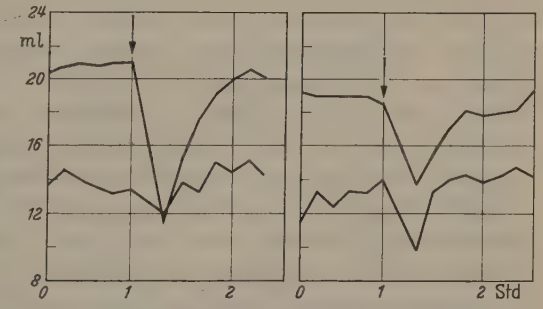


Abb. 3. Die Wirkung von 4,0 mg/kg Papaverin auf Sauerstoffverbrauch bei 20 und 30° C. Durchschnittsergebnisse von je 10 Rattenversuchen. O_2-Verbrauch während 10 min auf 100 cm² Körperoberfläche. Links narkotisierte, rechts wache Tiere

Versuche mit Papaverin. Da, wie bekannt, eine große Dosis Papaverin auch vorübergehenden Blutdruckfall verursacht, untersuchten wir die Wirkung von Papaverin auf den Gasstoffwechsel und den Einfluß der Narkose auf diese. Die verwendete Dosis war 4,0 mg/kg i.p. Größere

Dosen konnten wir nicht geben, da diese bei Ratten Krämpfe verursachen. Die durch Papaverin bewirkte Verminderung des O_2-Verbrauchs ist bei 20° C bedeutend geringer, als die des Doryls oder des Histamins: sowohl bei den wachen als bei den narkotisierten Tieren war der Gasstoffwechsel in den 50—70 min nach der Injektion normal. Die Wirkung des Papaverins war bei den narkotisierten Tieren stärker: diese verbrauchten 20,9 ml und die wachen Tiere 14,1 ml weniger O_2 in einer Stunde nach der Injektion als in der entsprechenden Periode der Messung des Grundumsatzes. Im Gegensatz zum Doryl und Histamin verursacht aber Papaverin bei 30° C keine Zunahme des O_2-Verbrauchs, eher sogar eine geringfügige Abnahme (Tab. 1, 2, Abb. 3).

Besprechung der Ergebnisse

Wir fanden bei Untersuchung von drei blutdrucksenkenden Pharmaka mit verschiedenen Angriffspunkten, daß diese den O_2-Verbrauch weißer Ratten bei 20° C Temperatur der Umgebung vermindern. Es ist bekannt, daß Histamin und Doryl die Hautgefäße stark erweitern; deshalb nimmt die Wärmeabgabe bei 20° C bedeutend zu. Dieser Faktor kann in der Verminderung des Gasstoffwechsels eine wichtige Rolle spielen. In der starken, wenngleich nur kurzdauernden blutdrucksenkenden Wirkung des Papaverins kann aber die Hautgefäßerweiterung nur eine untergeordnete Rolle spielen; trotzdem verminderte Papaverin den O_2-Verbrauch bei 20° C. Da die untersuchten drei Pharmaka unseres Wissens keine gemeinsamen biochemischen Angriffspunkte haben, müssen wir die Ursache der beobachteten Abnahme des O_2-Verbrauchs in der ihnen gemeinsam zukommenden blutdrucksenkenden Wirkung erblicken. Dafür spricht auch, daß die Senkung des Gasstoffwechsels geringer war oder überhaupt nicht stattfand und bei den nicht narkotisierten Ratten sich sogar in eine Zunahme des Gasstoffwechsels verwandelte, wenn die Gefäßwirkungen des Histamins und Doryls durch Synopen oder Atropin verhindert oder vermindert wurden.

Die Wirkung der drei Pharmaka war übereinstimmend bei narkotisierten Tieren größer und anhaltender als bei wachen. Das ist besonders auffallend, da der Blutdruck bei narkotisierten Tieren niedriger ist als bei wachen, und die Wirkung blutdrucksenkender Pharmaka um so kleiner ist je niedriger der Grundblutdruck. Wir können den Unterschied zwischen der Reaktion der zwei Rattengruppen nur mit der veränderten Reaktionsfähigkeit des Zentralnervensystems während der Narkose erklären. Auf Grund neuerer Untersuchungen beeinflußt nämlich der Zustand des Zentralnervensystems die Wirkung verschiedener Pharmaka bedeutend. Dieser Einfluß macht sich nach Untersuchungen von Pfeiffer (1955) vorwiegend im Sinne von Gegenregulationen geltend: das Zentralnervensystem (Cortex, aber auch Subcortex) ist bestrebt, die Wirkung

des Pharmakons zu vermindern. Pfeiffer bewies diese Tatsache in bezug auf verschiedene, zentral oder peripher angreifende Mittel, wie Adrenalin, Curare, Pilocarpin, Insulin und Aktedron. Zwei Hauptwege der Gegenregulation auf die Wirkung der Pharmaca sind vorstellbar: 1. Einfluß auf die Geschwindigkeit der Elimination, 2. Auslösung von Mechanismen, welche der Arzneiwirkung auf humoralem oder neuralem Wege entgegenwirken. Nach Pfeiffer spielt der zweite Weg eine größere Rolle. Die von uns untersuchten drei Pharmaka sind Stoffe, welche — im Verhältnis zur Geschwindigkeit, mit der ihre Wirkung aufhört — relativ langsam eliminiert werden; im Falle des Histamins ist sogar bewiesen (F. Herr 1951), daß seine Wirkung — ohne Anwesenheit von Antihistaminica — bei Bestehen noch bedeutender Blutkonzentration aufhört. Auch in unserem Falle ist es wahrscheinlicher, daß die Urethannarkose nicht den Stoffwechsel oder die Elimination der untersuchten blutdrucksenkenden Mittel beeinflußte, sondern daß die narkotisierten Tiere zu einer Gegenregulation weniger fähig sind und darum die Abnahme des Gasstoffwechsels größer ist und länger dauert, als bei wachen Tieren, bei denen eine kraftvolle Regulation gegen den Blutdruckfall und die anschließende Verminderung des O_2-Verbrauchs einsetzt, weshalb die Wirkung der Arzneibehandlung geringer ist und kürzer dauert.

Es ist bekannt, daß Doryl und Histamin — unabhängig von ihren Gefäßwirkungen — Adrenalin freisetzen; die gefäßverengernde und stoffwechselsteigernde Wirkung des freigesetzten Adrenalins spielt sicher eine wichtige Rolle bei der Gegenregulation, welche auch dadurch bewiesen wird, daß adrenalektomierte Ratten sowohl gegen Histamin als gegen Doryl empfindlicher sind. Da die Gegenregulation nach unserer Voraussetzung bei wachen Tieren stärker ist, ist verständlich, daß nach Vorbehandlung mit Synopen oder Atropin auch bei 20° C eine Stoffwechselzunahme der wachen Tiere zustande kommt, offenbar durch Wirkung des freigesetzten Adrenalins: bei narkotisierten Tieren — infolge ihrer verminderten Regulation — ist bei derselben Vorbehandlung nur eine Verminderung der Stoffwechselabnahme zu beobachten.

Bei 30° C steigern Doryl und Histamin sowohl bei wachen, als auch bei narkotisierten Tieren den O_2-Verbrauch, während Papaverin ihn unbedeutend vermindert. Der Grund der Veränderung des O_2-Verbrauchs ist aber bei dieser Temperatur nicht in dem Blutdruckfall zu suchen, da die Vorbehandlung mit Synopen bzw. Atropin, welche die Gefäßwirkungen des Histamins bzw. Doryls verhindert, die Stoffwechselwirkungen dieser Pharmaka bei dieser Temperatur nicht beeinflußt. Für die Steigerung des O_2-Verbrauchs ist wahrscheinlich vorwiegend die direkte adrenalinmobilisierende Wirkung des Doryls und Histamins verantwortlich. Dies beweist auch die Tatsache, daß bei

adrenalektomierten Tieren Histamin und Doryl bei dieser Temperatur kaum eine Zunahme des O_2-Verbrauchs verursachen und daß Papaverin, welches kein Adrenalin mobilisiert, den Gasstoffwechsel nicht erhöht. Es ist wahrscheinlich, daß der durch Papaverin verursachte Blutdruckfall eine geringe Menge von Adrenalin auf nicht spezifische Weise freisetzt; diese Menge ist aber nicht fähig, den O_2-Verbrauch über den Grundumsatz zu erhöhen. Die beobachteten Stoffwechselwirkungen auf die wachen und die narkotisierten Tiere zeigen bei 30° C einen Zusammenhang gleichen Charakters, wie bei 20° C, d. h. die Reaktion der narkotisierten Tiere ist größer. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist aber nicht so ausgeprägt wie bei niedrigerer Temperatur.

Zusammenfassung

1. Drei blutdrucksenkende Pharmaka mit verschiedenen Angriffspunkten (Histamin, Doryl, Papaverin) vermindern gleichermaßen den O_2-Verbrauch weißer Ratten bei 20° C. Diese Wirkung ist bei mit 0,8 g/kg Urethan narkotisierten Tieren viel größer und dauerhafter als bei wachen. Eine Vorbehandlung mit Synopen bzw. Atropin vermindert die Wirkung des Histamins bzw. Doryls bei narkotisierten Tieren; dagegen reagieren wache Tiere unter gleichen Umständen mit einer Zunahme des O_2-Verbrauchs.

2. Histamin und Doryl steigern, Papaverin dagegen beeinflußt kaum den Gasstoffwechsel bei 30° C Temperatur der Umgebung. Die Reaktion der mit Urethan narkotisierten Ratten ist auch bei dieser Temperatur größer als die der wachen, jedoch besteht ein kleinerer Unterschied zwischen den beiden Gruppen als bei 20° C. Die Vorbehandlung mit Synopen bzw. Atropin beeinflußt die Stoffwechselwirkung des Histamins bzw. Doryls bei dieser Temperatur nicht.

Literatur

Dale, H. H., and P. P. Laidlaw: J. Physiol. (Lond.) **43**, 182 (1911/12).

Fabinyi, M., u. J. Szebehelyi: Arch. int. Pharmacodyn. **75**, 402 (1948).

Gyermek, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **209**, 456 (1950).

Gyermek, L., u. Gy. Pataky: Acta physiol. Acad. Sci. hung. (Budapest) **2**, 179 (1951).

Herr, F.: Acta physiol. Acad. Sci. hung. (Budapest) **2**, 189 (1951).

Herr, F., u. J. Pórszász: Acta physiol. Acad. Sci. hung. (Budapest) **2**, 17 (1951).

Issekutz, B., u. B. Issekutz jr.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **199**, 306 (1942).

Issekutz, B. jr., I. Lichtneckert u. H. Nagy: Arch. int. Pharmacodyn. **81**, 35 (1953).

Jancsó, M.: Orv. Lapja **1947**, 1025.

Komlós, E., u. I. Földes: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 542 (1957).

Pfeiffer, A. K.: Der Einfluß des Zentralnervensystems auf die Arzneiwirkung. Dissertation. Budapest 1955.

Dr. Endre Komlós, Pathophysiolog. Abtlg. des „Koranyi" Landesinstituts für Tuberkulose, Budapest XII/Ungarn, Píhenő-út 1

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 35—45 (1958)

Aus dem pharmakologischen Laboratorium des VEB Deutsches Hydrierwerk Rodleben

Narkosepotenzierende und analgetische Wirkung von 1,4-Dipyrrolidino-2-butin

Von
D. Lenke

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Januar 1958)

1,4-Di-pyrrolidino-2-butin (DPB) ruft nach Everett (1956) und Everett, Blockus u. Shepperd (1956) bei verschiedenen Warmblütern einen gleichmäßigen Tremor, besonders von Kopf und Extremitäten, hervor. Der Angriffspunkt des Präparates scheint im Hirnstamm gelegen zu sein. Der Tremor tritt auch noch nach Decerebrierung und Decerebellierung auf. Spinaltiere zittern cranial der Schnittebene, caudal dagegen nicht.

Zum Tremor gesellen sich cholinergische Erregungserscheinungen (Speichel- und Tränenfluß, Miosis, Darmerregung). Auffallend ist ferner die Senkung der Körpertemperatur. Dieser Symptomenkomplex weist Ähnlichkeit mit dem Parkinsonismus auf, was durch die antagonistische Wirkung von „Antiparkinsonmitteln" wie Atropin, Trihexyphenidyl usw. bestätigt wird.

Solche Präparate heben Tremor und cholinergische Erscheinungen auf, und DPB ist nach Everett (1956) sehr gut zu ihrer Auffindung und quantitativen Auswertung geeignet. Im Verlauf einer solchen Versuchsreihe beobachteten wir, daß DPB bei Mäusen narkosepotenzierend und analgetisch wirkte. Wir prüften die narkosepotenzierende Wirkung an der Äther- und Hexobarbitalnarkose, die analgetische Wirkung im Vergleich mit Morphin und versuchten, beide Effekte mit Antiparkinsonmitteln zu beeinflussen.

Methodik

Es wurden 20—25 g schwere Albinomäuse eines eigenen Inzuchtstammes benutzt. Die Versuche erfolgten an Gruppen von 10 Tieren. Die Injektionsvolumina betrugen 0,1 ml/10 g.

Zur Äthernarkose verwendeten wir eine Apparatur, die der von Courvoisier, Fournel, Ducrot, Kolsky u. Koetschet (1953) beschriebenen ähnelte (Lenke 1957). 10 Mäuse wurden unter einer Glasglocke (22 l) 15 min lang der Wirkung von 6 ml Äther ausgesetzt, die in der Glocke verdampften. Nach dieser Zeit wurden die Tiere herausgenommen, auf den Rücken gelegt und als Narkosedauer die Zeit bis zur Einnahme der normalen Lage gemessen.

Bei den Versuchen mit Hexobarbital-Na erhielten die Tiere 40 mg/kg in 30 sec i.v. Diese Dosis ruft bei unbehandelten Tieren nur Exzitation, bestenfalls Seitenlage unter 1 min Dauer hervor. Nach Präparatbehandlung traten längerdauernde Narkosen auf. Die Präparate wurden von den Narcotica i.p. oder s.c. injiziert. Analgesiemessungen nahmen wir mit Hilfe elektrischer und thermischer Reizung vor.

Zur Prüfung mit elektrischer Reizungs-Methode (Reinhard u. de Beer 1952), wurden, wie von Friebel u. Reichle (1955) angegeben, die Elektroden am Schwanz angebracht. Die Reizung erfolgte mit dem „Stimulator" (Netheler & Hinz, Hamburg) mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Impulsdauer von 15 msec und $R_i = > 100 k\Omega$. Die Impulsstärke von 0,8 Milliamp. reichte aus, um bei den meisten Tieren nach 2—4 Impulsen eine Schmerzreaktion in Form von Piepsen hervorzurufen. Tiere, die nach mehr als 4 Impulsen piepsten, schieden aus. Die analgetische Wirkung der Präparate wurde an Gruppen von 10 Tieren 20 min nach der s.c. Injektion gemessen und als positiv bezeichnet, wenn die Tiere erst nach 6 und mehr (maximal 10) Impulsen piepsten.

Die Analgesieprüfung mit thermischer Reizung erfolgte auf der „heißen Platte" nach Woolfe u. MacDonald (1944). Die Tiere wurden auf eine mit Hilfe eines Thermostaten auf 55° C geheizte Kupferplatte gesetzt und als Reaktionszeit die Zeit bis zur ersten Reaktion, die durch Aufheben der Vorderbeine gekennzeichnet war, bestimmt. Tiere mit zweifelhaften Reaktionen schieden aus.

Wie bei den Versuchen mit elektrischer Reizung wurde die analgetische Wirkung 20 min nach der s.c. Präparatinjektion gemessen. Die mittlere Reaktionszeit betrug bei 160 Tieren 2,6 ± 0,04 sec. Bei Reaktionszeiten über 5 sec wurde die Analgesie als positiv bezeichnet. — Die mittleren wirksamen Dosen (DE 50) wurden nach Litchfield u. Wilcoxon (1949) bestimmt.

In die Prüfungen wurden außer dem 1,4-Di-pyrrolidino-2-butin-2 HCl (DPB) die folgenden Präparate einbezogen: Atropinsulfat, Scopolaminhydrochlorid, Trihexyphenidyl (1-Phenyl-1-cyclohexyl-3-piperidino-propanol-1-hydrochlorid), Ethopropazin (N-(2′-Diäthylamino-2′-methyl-äthyl)-phenothiazin-hydrochlorid), Promethazin (N(2′-Dimethyl-amino-methyl-äthyl)-phenothiazin-hydrochlorid) und Thiazinamium (N(2′-Dimethylamino-2′-methyläthyl)-phenothiazin-methyl-sulfat).

Ergebnisse

1. Verlängerung der Äthernarkose durch DPB und ihre antagonistische Beeinflussung

Die Äthernarkose, deren Dauer bei den Kontrollmäusen 2,6 ± 0,028 min betrug, wird schon durch kleine intraperitoneale DPB-Gaben verlängert. Mit 1,25 mg/kg DPB nahm die Narkosedauer um das Dreifache zu. Die maximale Verlängerung wurde zwischen 40 und 80 mg/kg erreicht und betrug etwa das 15fache des Ausgangswertes (Abb. 1). Allerdings trat bei 80 mg/kg eine Mortalität von 30% auf. Die Narkosepotenzierung findet in einem Dosenbereich statt, in welchem auch der für DPB typische Tremor und die cholinergischen Erregungserscheinungen beobachtet werden. Der Tremor wird durch die Narkose unterdrückt, tritt aber nach dem Herausnehmen aus der Narkoseglocke, noch ehe die Tiere erwacht sind und sich umgedreht haben, wieder in Erscheinung.

Werden die Tiere 15 min vor Narkosebeginn mit einem Antiparkinsonmittel subcutan vorbehandelt und erhalten 5 min später eine bestimmte Dosis DPB intraperitoneal, dann gelingt es, die narkosepotenzierende

DPB-Wirkung zu verringern oder aufzuheben. Dieser Antagonismus ist besonders augenfällig bei Atropin oder Scopolamin. Abb. 2 zeigt einen solchen Versuch, bei dem nach einer Dosis von 5,0 mg/kg Atropin oder

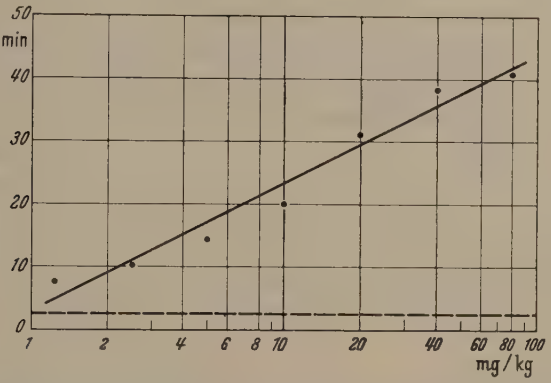


Abb. 1. Wirkung von DPB auf die Äthernarkose bei der Maus. DPB-Injektionen 10 min vor Narkosebeginn i.p. Abszisse: DPB-Dosis (logarithmisch); Ordinate: Narkosedauer; gestrichelte Linie: Narkosedauer der unbehandelten Kontrolltiere

1,0 mg/kg Scopolamin verschiedene DPB-Dosen (1,25—40 mg/kg) gegeben wurden, deren Wirkung erheblich reduziert ist. 40 mg/kg DPB verursachen jetzt nur noch eine Narkosedauer von 7,2 min (Scopolamin) bzw. 8,5 min (Atropin) im Gegensatz zu 34,8 min ohne Vorbehandlung. 1,25 und 2,5 mg/kg DPB bewirken keine signifikante Narkoseverlängerung mehr. Die gewählten Atropin- und Scopolamindosen waren fast wirkungsgleich, so daß sich für beide Präparate ein Wirkungsverhältnis von etwa 1:5 ergibt.

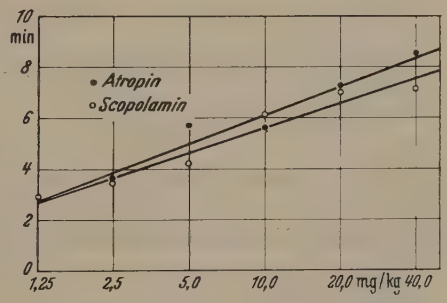


Abb. 2. Verminderung der äthernarkosepotenzierenden DPB-Wirkung durch Atropin und Scopolamin. Atropin (5,0 mg/kg) oder Scopolamin (1,0 mg/kg) wurden 5 min vor, DPB (verschiedene Dosen) subcutan injiziert. Abszisse: DPB-Dosis (logarithmisch); Ordinate: Narkosedauer

Ähnlich wie Atropin und Scopolamin vermögen auch Trihexyphenidyl, Ethopropazin, Promethazin und Thiazinamium die Narkosepotenzierung durch DPB zu vermindern (Tab. 1). In diesen Versuchen wurden bei konstanter DPB-Dosis (10 mg/kg) die prophylaktischen Gaben der Präparate variiert. Eine dem Atropin und Scopolamin vergleichbare Abnahme konnte erst mit höheren Dosen erzielt werden. Am wirksamsten waren Trihexyphenidyl und Thiazinamium. Ethopropazin und

Tabelle 1. *Beeinflussung der äthernarkoseverlängernden DPB-Wirkung bei der Maus durch verschiedene Präparate*
Die Injektion der Präparate erfolgte s.c. 15 min vor Narkosebeginn, die des DPB i.p. 10 min vor Narkosebeginn

Vers.	Vorbehandlung		DPB mg/kg	Tiere pro Gruppe	Narkosedauer min	Verminderung der DPB-Wirkung %[1]	Statistische Sicherung $p = 0{,}0027$ [2]
	Präparat	mg/kg					
1	—	—	—	170	2,6 ± 0,028	—	
2	—	—	10	20	19,9 ± 0,83	—	gesichert (1—2)
3	Atropin	5,0	—	10	3,4 ± 0,44	—	nicht gesichert (1—3)
4	Atropin	2,5	10	10	6,0 ± 0,3	81	gesichert (2—4)
5	Atropin	5,0	10	10	5,6 ± 0,45	83	gesichert (2—5)
6	Scopolamin	2,0	—	10	4,1 ± 0,32	—	gesichert (1—6)
7	Scopolamin	0,5	10	10	6,8 ± 0,42	76	gesichert (2—7)
8	Scopolamin	1,0	10	10	6,1 ± 0,33	80	gesichert (2—8)
9	Scopolamin	2,0	10	10	4,6 ± 0,48	89	gesichert (2—9)
10	Trihexyphenidyl	10,0	—	10	5,8 ± 0,91	—	gesichert (1—10)
11	Trihexyphenidyl	10,0	10	10	6,0 ± 0,42	81	gesichert (2—11)
12	Ethopropazin	40,0	—	10	6,2 ± 0,5	—	gesichert (1—12)
13	Ethopropazin	20,0	10	10	11,7 ± 0,41	47	gesichert (2—13)
14	Ethopropazin	40,0	10	10	7,9 ± 0,49	70	gesichert (2—14)
15	Promethazin	10,0	—	10	6,4 ± 0,45	—	gesichert (1—15)
16	Promethazin	10,0	10	10	13,1 ± 0,9	39	gesichert (2—16)
17	Promethazin	20,0	—	10	7,0 ± 0,77	—	gesichert (1—17)
18	Promethazin	20,0	10	10	12,2 ± 0,85	45	gesichert (2—18)
19	Thiazinamium	10,0	—	10	3,4 ± 0,44	—	nicht gesichert (1—19)
20	Thiazinamium	10,0	10	10	6,8 ± 0,31	76	gesichert (2—20)

[1] Die Werte liegen zwischen 2,6 min = 100% (Versuch 1) und 19,9 min = 0% (Versuch 2).
[2] Die Zahlen in Klammern geben an, welche Versuche verglichen wurden.

Promethazin waren nicht in der Lage, eine Abnahme der DPB-Wirkung von mehr als 50% zu bewirken. Scopolamin (2,0 mg/kg), Trihexyphenidyl (10 mg/kg), Ethopropazin (40 mg/kg) und Promethazin (10 und 20 mg/kg) verlängerten allein ebenfalls die Äthernarkose.

2. Verlängerung der Hexobarbitalnarkose durch DPB und antagonistische Beeinflussung

Die Hexobarbitalnarkose wird ebenso wie die Äthernarkose durch DPB potenziert. Die Wirkung war hier noch intensiver, weil die verwendete Hexobarbitaldosis (40 mg/kg) allein keine oder nur eine sehr kurz dauernde Narkose (durchschnittliche Dauer 0,3 $\pm$ 0,076 min) hervorrief. Die Dosis-Wirkungskurve der Abb. 3 verläuft bei halblogarithmischer Darstellung nicht wie die der Äthernarkose (Abb. 1) linear, sondern steigt nach anfänglich mehr flachem Verlauf nahe bei der DPB-Dosis 10 mg/kg steil an, so daß die Kurve, wenn man sich den linken Schenkel nach den kleinen Dosen zu verlängert denkt, einer Hyperbel ähnelt, deren Scheitelpunkt in der Nähe von 10 mg/kg liegt. Der Versuch schließt in Anbetracht der toxischen Wirkung höherer DPB-Dosen bei 20 mg/kg ab.

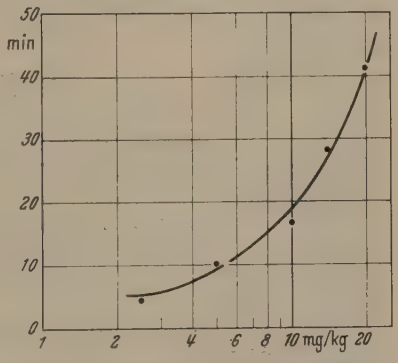


Abb. 3. Verlängerung der Hexobarbitalnarkose durch DPB. Intraperitoneale Injektion von DPB 10 min vor 40 mg/kg Hexobarbital i.v. Abszisse: Log DPB-Dosis; Ordinate: Narkosedauer

Wie die Äthernarkose-, wird auch die Hexobarbitalnarkosepotenzierung durch DPB von den verschiedenen Antiparkinsonmitteln antagonistisch beeinflußt (Tab. 2). Die Dosis-Wirkungsverhältnisse sind denen bei der Äthernarkose sehr ähnlich. Nur das Promethazin, das selbst von allen Präparaten am stärksten potenzierend wirkte, verursachte in Verbindung mit DPB eine erhebliche Verlängerung der Narkosedauer.

3. Analgetische Wirkung von DPB und antagonistische Beeinflussung

Die analgetische DPB-Wirkung nach subcutaner Injektion konnte sowohl bei den Versuchen mit elektrischer, als auch mit thermischer Reizung nachgewiesen werden. Im Vergleich mit Morphin war das Präparat bei der Analgesieprüfung auf der heißen Platte gleich wirksam, während es bei elektrischer Reizung doppelt so stark wirkte (Tab. 3). Orientierende Versuche mit mechanischer Reizung durch Kneifen in den Schwanz ließen ebenfalls die analgetische Wirkung erkennen.

Tabelle 2. *Beeinflussung der hexobarbitalnarkoseverlängernden DPB-Wirkung bei der Maus durch verschiedene Präparate*
Die Präparatinjektionen erfolgten s.c. 15 min vor Hexobarbital-Na (40 mg/kg i.v.), die des DPB i.p. 10 min vor Hexobarbital-Na

Vers.	Vorbehandlung		DPB	Tiere pro Gruppe	Narkosedauer	Verminderung der DPB-Wirkung	Statistische Sicherung $p = 0{,}0027$
	Präparat	mg/kg	mg/kg		min	%	
1	—	—	—	40	0,3 ± 0,076	—	gesichert (1—2)
2	—	—	20	20	39,6 ± 1,0	—	
3	Atropin	5,0	—	10	0,63 ± 0,18	—	nicht gesichert (1—3)
4	Atropin	0,5	20	10	13,9 ± 0,74	65	gesichert (2—4)
5	Atropin	2,0	20	10	3,6 ± 0,63	92	gesichert (2—5)
6	Scopolamin	1,0	—	10	1,7 ± 0,34	—	gesichert (1—6)
7	Scopolamin	0,025	20	10	15,7 ± 1,36	61	gesichert (2—7)
8	Scopolamin	0,2	20	10	2,9 ± 0,49	93	gesichert (2—8)
9	Trihexyphenidyl	10	—	10	0,92 ± 0,2	—	nicht gesichert (1—9)
10	Trihexyphenidyl	5	20	10	10,2 ± 1,2	75	gesichert (2—10)
11	Trihexyphenidyl	10	20	10	3,9 ± 0,7	91	gesichert (2—11)
12	Ethopropazin	40	—	10	3,6 ± 0,49	—	gesichert (1—12)
13	Ethopropazin	20	20	10	13,8 ± 1,9	65	gesichert (2—12)
14	Ethopropazin	40	20	10	16,3 ± 0,8	59	gesichert (2—14)
15	Promethazin	20	—	10	13,1 ± 1,6	—	gesichert (1—15)
16	Promethazin	10	20	10	64,4 ± 7,0	165 (Zunahme!)	gesichert (2—16)
17	Thiazinamium	20	—	10	0,44 ± 0,1	—	nicht gesichert (1—17)
18	Thiazinamium	10	20	10	12,1 ± 1,1	70	gesichert (2—18)
19	Thiazinamium	20	20	10	5,6 ± 0,58	86	gesichert (2—19)

Die mittlere wirksame Dosis ist bei elektrischer Reizung so niedrig, daß die typischen DPB-Symptome nicht oder nur sehr geringfügig in Erscheinung traten.

Nach den Ergebnissen der Narkoseversuche lag der Versuch nahe, die Analgesie durch die verschiedenen Präparate aufzuheben. Die elektrische Reizung schien hierfür besonders geeignet, weil die Reaktionen der Tiere exakter als auf der heißen Platte zu beurteilen sind. Für die Prüfungen wurde mit 5 mg/kg eine DPB-Dosis gewählt, die bei 80% der Tiere Analgesie hervorrief und als DE 50 die Präparatdosis bestimmt, welche die DE 80 des DPB in eine DE 50 verwandeln konnte.

Tabelle 3. *Analgetische Wirkung von DPB und Morphin an Mäusen*
Die Injektionen erfolgten s.c. 20 min vor der Analgesieprüfung

Präparat	DE 50 mg/kg	Tiere n	Wirkung Morphin = 100	statistische Sicherung $p = 0{,}05$
a) Versuche mit elektrischer Reizung				
DPB	3,6 (2,2— 5,7)	50	220	gesichert
Morphin	7,9 (4,4—13,7)	40	100	
b) Versuche mit der heißen Platte				
DPB	7,5 (4,4—12,6)	30	106	kein signifikanter
Morphin	7,9 (5,9—10,4)	50	100	Unterschied

Tabelle 4a. *Verminderung der analgetischen DPB-Wirkung bei der Maus bei elektrischer Reizung*
Die Injektion der Präparate erfolgte i.p., 25 min vor der Analgesieprüfung, die des DPB (5 mg/kg) s.c., 20 min vor der Analgesieprüfung

Vers.	Präparat	DE 50 mg/kg	Tiere n	Atropinwirkung = 100
1	Atropin	0,62 (0,25 — 1,55)	30	100
2	Scopolamin	0,041 (0,025— 0,067)	50	1500
3	Trihexyphenidyl	1,05 (0,54 — 2,02)	50	59
4	Ethopropazin	7,8 (5,4 —14,4)	40	8,5
5	Promethazin	4,9 (2,6 — 9,1)	30	12,6
6	Thiazinamium	2,6 (1,3 — 5,2)	30	23,9

Es gelang mit allen 6 Präparaten die analgetische DPB-Wirkung zu vermindern bzw. aufzuheben (Tab. 4a). Die Wirkungsdifferenzen sind statistisch gesichert. Die wirksamen Dosen sind infolge der kleineren DPB-Dosis und der im Gegensatz zu den Narkoseversuchen festgelegten weniger intensiven antagonistischen Wirkung der Präparate (Überführung der DE 80 in eine DE 50 s.o.) niedriger als in den Narkoseversuchen. Auch hier steht das wesentlich stärker als Atropin wirkende Scopolamin an der Spitze der Präparate. Promethazin war ebenfalls wirksam. Die Reihenfolge der übrigen Präparate entspricht der bei den Narkoseversuchen.

Im letzten Versuch (Tab. 4b) wurde der Antagonismus DPB-Atropin an der heißen Platte bestätigt. In den Versuchen wurden die Häufigkeiten des Auftretens der analgetischen Wirkung (Verlängerung der Reaktionszeit auf >5 sec) in den einzelnen Gruppen verglichen. Bei 60% der mit DPB (10 mg/kg) behandelten Tiere wurde Analgesie festgestellt. Atropinvorbehandlung (5 mg/kg) hob diese Wirkung vollständig auf.

Tabelle 4b. *Aufhebung der analgetischen DPB-Wirkung bei Mäusen durch Atropin (heiße Platte)*
Applikation der Präparate und Injektionsfolgen siehe Tab. 4a.

Gruppe	Vorbehandlung		DPB	Tiere n	Reaktionszeit $>5{,}0$ sec		Statist. Sicherung $p = 0{,}0027$
	Präparat	mg/kg	mg/kg		n	%	
1	—	—	—	20	0	0	—
2	Atropin	5	—	10	1	10	—
3	—	—	10	20	12	60	gesichert (1—3)
4	Atropin	5	10	20	0	0	gesichert (3—4)

In einigen Versuchen wurde geprüft, ob DPB wie morphinartige Analgetica (Schaumann, Giovannini u. Jochum 1952) hemmende Wirkung auf den peristaltischen Dehnungsreflex am isolierten Meerschweinchen-Ileum ausüben kann. Es wirkte bis zu einer Konzentration von 10^{-4} weder hemmend noch erregend auf die Darmstücke ein.

Diskussion

Es ergibt sich die Frage nach dem Angriffspunkt dieser DPB-Wirkungen, nach den Beziehungen zwischen Tremor und cholinergischen Erscheinungen einerseits und der narkoseverlängernden und analgetischen Wirkung andererseits sowie nach dem Mechanismus der antagonistischen Beeinflussung dieser Symptome durch Antiparkinsonmittel.

Für zentrales Zustandekommen der narkoseverlängernden Wirkungen spricht die Tatsache, daß DPB, wie z. B. auch Chlorpromazin, sowohl die Äther- als auch die Hexobarbitalnarkose verlängert. Peripher angreifende Präparate, z. B. das β-Diäthylaminoäthyl-diphenyl-propylacetat (SKF 525-A) (Cook, Toner u. Fellows 1954; Axelrod, Reichenthal u. Brodie 1954), welche durch Fermenthemmung den Hexobarbitalabbau verzögern und auf diese Weise die Narkose verlängern, haben keinen Einfluß auf die Äthernarkose. Nach Versuchen von Everett (1956) läßt sich der zentrale Angriffspunkt soweit lokalisieren, daß Großhirn, Kleinhirn und Rückenmark ausgeschlossen werden konnten.

Der Tremor und die cholinergischen Erscheinungen könnten ohne Beeinflussung höherer Zentren durch efferente Impulse von dem wohl im Hirnstamm gelegenen Angriffspunkt des DPB, ausgelöst werden. Außerdem rufen afferente Impulse in höheren Zentren (Cortex) hemmende

Wirkungen hervor, die in Form von Narkoseverlängerung und Verminderung von Schmerzreaktionen nachgewiesen werden konnten. Hess (1954) beschreibt das zuweilen gleichzeitige Auftreten von Müdigkeit und Schlafsucht und motorischen Effekten an den Extremitäten und im Gesicht von Katzen nach elektrischer Zwischenhirnreizung mit bestimmten Impulsformen.

Mit Anticholinergica, die auch wichtige Antiparkinsonmittel sind, wie Atropin, Scopolamin und Trihexyphenidyl, sowie mit Phenothiazinderivaten, die, wie z. B. Ethopropazin, als Antiparkinsonmittel bekannt sind und wie Promethazin den Nicotintremor beim Kaninchen hemmen (Bovet u. Longo 1951; Hutcheon 1953), kann die narkoseverlängernde und analgetische DPB-Wirkung antagonistisch beeinflußt werden. Das gelingt besonders gut mit den genannten Anticholinergica. Auch das als quaternäre Ammoniumbase stärker anticholinergisch als die beiden tertiären Amine Promethazin und Ethopropazin (Decourt 1950; Ducrot u. Decourt 1950) wirkende Thiazinamium ist wirksamer als die letzteren. Die zur Aufhebung von Tremor und Narkoseverlängerung benötigten Mengen der einzelnen Präparate liegen in der gleichen Größenordnung.

Bei Ratten beträgt die den Tremor verhindernde mittlere Atropindosis (Dosis, die, 10 min vor 20 mg/kg DPB s.c. injiziert, bei 50% der Tiere bis zu 20 min nach der i.p. DPB-Injektion das Zittern unterdrückt) 1,85 (1,08—3,18) mg/kg. 20 mg/kg DPB i.p. bewirken bei der Ratte eine Verlängerung der Äthernarkose von $3{,}8 \pm 0{,}35$ min auf $19{,}4 \pm 0{,}53$ min, die durch Vorbehandlung mit 2,0 mg/kg Atropin auf $5{,}4 \pm 0{,}85$ min reduziert wird.

Diese Dosengleichheit macht die Existenz eines kompetitiven Antagonismus zwischen DPB und den geprüften Präparaten im Angriffsgebiet des DPB wahrscheinlich. Antiparkinsonmittel können so nicht nur die oben angenommenen efferenten motorischen und vegetativen Erregungen durch DPB blockieren, sondern auch die zentralhemmenden afferenten Impulse ausschalten. Dabei bleibt ihre eigene zentrallähmende Wirkung erhalten, die nach Longo (1956) und Bovet u. Longo (1956) in einer Veränderung der elektrischen Aktivität der Hirnrinde im Sinne eines schlafähnlichen ECG und in der Unterdrückung der auf Reizung der formatio reticularis folgenden Weckreaktion bestehen. Die bekannte cortical dämpfende Wirkung dieser Mittel kommt in den vorliegenden Versuchen durch die Verlängerung der Hexobarbitalnarkose zum Ausdruck (Tab. 2, Vers. 3, 6, 9, 12 u. 17). Diese Wirkung war beim Scopolamin, Ethopropazin und Promethazin signifikant, beim Atropin, Trihexyphenidyl und Thiazinamium ebenfalls vorhanden, aber nicht statistisch zu sichern. Wenn DPB auch durch direkten corticalen Angriffspunkt narkosepotenzierend wirkte, wäre doch eher ein Synergismus mit der Gruppe der Antiparkinsonmittel zu erwarten. Nur das Promethazin, das selbst stark narkosepotenzierend wirkte, verstärkte bei der

Hexobarbitalnarkose die DPB-Wirkung im Sinne einer additiven Wirkung (Tab. 2, Vers. 10).

Die analgetische Wirkung des DPB, die quantitativ der des Morphins entspricht unterscheidet sich qualitativ von den morphinartigen Analgetica (Schaumann, Giovannini u. Jochum 1952) in einer Eigenschaft. Es ist nicht wie diese in der Lage, den peristaltischen Dehnungsreflex des isolierten Meerschweinchenileums aufzuheben. Es ruft am isolierten Darm auch keine Muskelerregung hervor. Die cholinergischen Erscheinungen sind zentralen Ursprungs. Der Mechanismus der Reaktionsverminderung auf Schmerzreize unterscheidet sich anscheinend von dem morphinartiger Analgetica.

Zusammenfassung

1,4-Di-pyrrolidino-2-butin (DPB) bewirkt in Versuchen an Mäusen in Dosen, die Tremor und cholinergische Erregungserscheinungen hervorrufen, Verlängerung der Äther- und Hexobarbitalnarkose. Nach thermischer und elektrischer Reizung ist eine analgetische Wirkung festzustellen, die quantitativ etwa der des Morphins entspricht. Qualitativ besteht zwischen DPB und morphinähnlichen Analgetica der Unterschied, daß DPB nicht den peristaltischen Dehnungsreflex aufhebt. Die auch als Antiparkinsonmittel gebrauchten Anticholinergica Atropin, Scopolamin und Trihexyphenidyl sowie die Phenothiazinabkömmlinge Ethopropazin, Promethazin und Thiazinamium heben in Dosen, die den Tremor antagonistisch beeinflussen, auch die narkoseverlängernde und analgetische Wirkung der DPB auf. Die Anticholinergica sind den übrigen Präparaten überlegen.

Ich danke Fräulein B. Dartsch und Chr. Strutzberg für ihre verständnisvolle technische Assistenz bei den Versuchen.

Literatur

Axelrod, J., J. Reichenthal and B. B. Brodie: Mechanism of the potentiating action of β-diethylaminoethyldiphenylpropylacetate. J. Pharmacol. exp. Ther. **112**, 49—54 (1954).

Bovet, D., and V. G. Longo: The action on nicotine-induced tremors of substances effective in parkinsonism. J. Pharmacol. exp. Ther. **102**, 22—30 (1951).

Bovet, D., et V. G. Longo: Pharmacologie de la substance reticulée du tronc cérébral. XX^{e} Congress intern. de Physiologie Bruxelles. I. Résumés des rapports, 306—329 (1956).

Cook, L., J. J. Toner and E. J. Fellows: The effect of β-diethylaminoethyldiphenylpropylacetate hydrochloride (SKF No. 525-A) on hexobarbital. J. Pharmacol. exp. Ther. **111**, 131—141 (1954).

Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Propriétes pharmacodynamiques du chlorhydrate de chloro-3-(diméthylamino-3′-propyl)-10-phénothiazine (4.560 R.P.). Arch. int. Pharmacodyn. **92**, 305—361 (1953).

Decourt, Ph. Un nouvel agent thérapeutique à fonction mixte, antihistaminique et anticholinergique, le thiazinamon ([phénothiazinyl-10′]-1-propyl-2-N-triméthyl ammonium). Bull. Acad. nat. Méd. (Paris) **134**, 632—636 (1950).

Ducrot, R., et Ph. Decourt: Actions pharmacodynamiques d'un dérivé à fonction amm nium quaternaire de la phénothiazine (3554 R.P.) en dehors de son action antihistaminique. C. R. Soc. Biol. (Paris) **144**, 911—913 (1950).

Everett, G. M.: Tremor produced by drugs. Nature (Lond.) **177**, 1238 (1956).
Everett, G. M.: A study of tremor and the parkinson-like syndrom produced by 1,4-pyrrolidino-2-butyn, „Tremorine". XXth Internat. Physiol. Congr. Brussels. Abstr. of Communications, 281—282 (1956).
Everett, G. M., L. E. Blockus and I. M. Shepperd: Tremor induced by Tremorine and its antagonism by antiparkinson drugs. Science **124**, 79 (1956).
Friebel, H., u. C. Reichle: Zur analgetischen und analgesieverstärkenden Wirkung von Chlorpromazin (Megaphen). Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **226**, 551—557 (1955).
Hess, W. R.: Das Zwischenhirn, 2. Aufl. Basel: Benno Schwabe & Co. 1954.
Huttheon, D. E.: A comparison of the pharmacological actions of phenothiazine derivates used in the treatment of parkinsonism. J. Pharmacol. exp. Ther. **108**, 340—348 (1953).
Lenke, D.: Über pharmakologische Wirkungen von Phthalazin- und Phthalazonderivaten (II. Teil). Arzneimittel-Forsch. **8**, 219 (1958).
Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. exp. Ther. **96**, 99—117 (1949).
Longo, V. G.: Effects of scopolamine and atropine on electroencephalographic and behavioral reactions due to hypothalamic stimulation. J. Pharmacol. exp. Ther. **120**, 192—208 (1956).
Reinhard, J. F., and E. J. de Beer: in Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological Standardization, 2nd Ed., 316—318. Oxford University Press 1952.
Schaumann, O., M. Giovanni u. K. Jothum: Morphinähnlich wirkende Analgetica und Darmmotorik. I. Spasmolyse und Peristaltik. Naunyn-Schmiederberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 460—468 (1952).
Woolfe and MacDonald: J. Pharmacol. exp. Ther. **80**, 300 (1944), in: Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological Standardization, 2nd Ed. 315—316. Oxford University Press 1952.

Dr. D. Lenke, Pharmakologisches Laboratorium des VEB,
Deutsches Hydrierwerk Rodleben,
Post Roßlau/Elbe

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 46—65 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns*

Von
W. Koransky

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. März 1958)

Bei der pharmakologischen Prüfung krampferzeugender und antikonvulsiver Stoffe ergaben sich Befunde (Coper, Herken u. Koransky 1954), die auf eine Beteiligung der freien Nucleotide des Gehirns an den Funktionsänderungen hinwiesen. Eine genaue Kenntnis der Art und der Konzentration dieser Nucleotide im Gehirn erschien darum für die Aufklärung der biochemischen Reaktionen, die den zentralnervösen Vorgängen zugrunde liegen, besonders wichtig.

Eine vollständige Analyse aller im Zentralnervensystem vorkommenden säurelöslichen Nucleotide scheiterte bisher am Fehlen einer geeigneten Bestimmungsweise. Durch die von Cohn (1950), Cohn u. Carter sowie von Hurlbert, Schmitz, Brumm u. Potter entwickelten Verfahren der Ionenaustauschchromatographie hatte sich jedoch in neuerer Zeit eine Möglichkeit zur Trennung von Stoffgemischen mit einer großen Zahl von Einzelsubstanzen ergeben. Hurlbert u. Potter sowie Schmitz, Hurlbert u. Potter gelang mit Hilfe dieser Methode die Auffindung vordem unbekannter Nucleotide, die als charakteristischen Bestandteil andere Basen als Adenin enthalten.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen über das Vorkommen dieser Nucleotide in den Organen des Warmblüters erstrecken sich nur auf ihre qualitative Erfassung in der Leber, der Muskulatur und in einigen bösartigen Geschwülsten. In einer der Arbeiten (Schmitz, Potter, Hurlbert u. White) wurde beiläufig auch ein Beispiel für die Auftrennung der Nucleotide des Gehirns demonstriert, auf eine vollständige Trennung der einzelnen Substanzen voneinander und ihre nähere Charakterisierung jedoch verzichtet.

Die quantitative Bestimmung möglichst aller vorkommenden Nucleotide nebeneinander ist mit dem neuen Verfahren noch nicht versucht worden. Ihr stellten sich in eigenen Experimenten methodische Schwierigkeiten entgegen, die eine weitere Bearbeitung des Verfahrens notwendig machten. Im folgenden wird über die Versuche berichtet, die

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ionenaustauschchromatographie abzuwandeln und zu verfeinern, und mit ihr unter Heranziehung papierchromatographischer, spektralphotometrischer und anderer analytischer Verfahren möglichst alle säurelöslichen Nucleotide des Rattengehirnes zu isolieren, zu charakterisieren und quantitativ zu bestimmen.

Methoden

1. Darstellung des Gehirnextraktes. Die große Geschwindigkeit der Stoffwechselprozesse im Gehirn erfordert eine rasche Unterbrechung aller fermentativen Reaktionen nach der Tötung der Tiere. Zu diesem Zweck wurde, einer Angabe von Opitz folgend, eine Guillotine mit einem T-förmigen Messer konstruiert, das den Schädel der Versuchstiere bei der Dekapitation gleichzeitig in der Medianlinie spaltet. Die so freigelegten Hirnhälften wurden mit einem löffelartigen Instrument entnommen und sofort in flüssige Luft eingebracht, so daß zwischen der Dekapitation und dem Einfrieren nur etwa 5 sec verstrichen. Die gefrorenen Gehirne wurden in einem Metallmörser zerkleinert und anschließend in 1 n Perchlorsäure bei 0° C und 15000 U/min homogenisiert und extrahiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte bei einer Temperatur von — 5 bis 0° C. Zunächst wurde der säureunlösliche Rückstand bei 20000 $\times$g abzentrifugiert und nochmals mit dem gleichen Volumen 0,5 n $HClO_4$ extrahiert. Bei der Neutralisation der vereinigten Extrakte mit 5 n KOH gegen Phenolrot unter guter Kühlung fällt unlösliches Kaliumperchlorat aus, das ebenfalls abzentrifugiert wurde. Der auf diese Weise dargestellte Extrakt kam ohne weitere Behandlung auf die Austauschersäule zur Chromatographie.

2. Chromatographie der Nucleotide. Die chromatographische Trennung erfolgte über den Anionenaustauscher Dowex 1 in der Formiatform nach der von Hurlbert, Schmitz, Brumm u. Potter angegebenen Methode der Gradientenelution. Die Abmessung von Säule und Mischgefäß sowie Menge und Konzentration der benutzten Elutionsmittel werden jeweils bei den einzelnen Chromatogrammen angegeben. Die Elution der Substanzen wurde zunächst durch Ameisensäure steigender Konzentration bewirkt, der im Verlauf der Chromatographie zunehmende Mengen an Ammoniumformiat zugesetzt wurde. Die Auftrennung eines Gehirnextraktes mit diesem System — im folgenden S I genannt — ergibt 9 deutlich voneinander abgegrenzte Banden (1—9). Abb. 1. Nach Isolierung der in diesen Banden enthaltenen Substanzen wurden diese zum Beweis ihrer Reinheit oder zur weiteren Auftrennung einer erneuten Chromatographie unterworfen. Hierbei wurde die Elution durch Ammoniumformiat-Pufferlösungen langsam ansteigender Konzentration vom p_H 4—5 und nach fortgeschrittener Elution vom p_H 3—4 bewirkt (S II). Durch die Anwendung dieser beiden Elutionssysteme S I und S II gelang es, alle im Gehirnextrakt vorhandenen Nucleotide weitgehend voneinander zu trennen.

Um quantitativ reproduzierbare Werte vor allem bei den später durchgeführten vergleichenden Untersuchungen zu erhalten, waren einige Veränderungen der ursprünglichen Methodik notwendig. Für eine exakte Trennung der an den Austauscher gebundenen Nucleotide waren nicht nur die Abmessung von Austauschersäule und Mischgefäß sowie Art und Konzentration des Elutionsmittels, sondern auch die Geschwindigkeit der Elution bedeutungsvoll. Die zuerst von Hurlbert, Schmitz, Brumm u. Potter beschriebene Versuchsanordnung, bei der das Elutionsmittel mit Hilfe von Druckluft durch die Säule getrieben wurde, erwies

sich als unzureichend für eine genaue Regulation der Durchlaufgeschwindigkeit. Die im voraus nicht abzusehende Quellung der Austauscherpartikel änderte stetig den Strömungswiderstand im System und bewirkte dadurch schwankende Elutionsgeschwindigkeiten. Diese Schwierigkeit ließ sich überwinden durch Konstruktion einer Infusionsmaschine, die mit Hilfe von motorgetriebenen Glasspritzen das Elutionsmittel mit gleichbleibender Geschwindigkeit durch die Apparatur preßte. Um

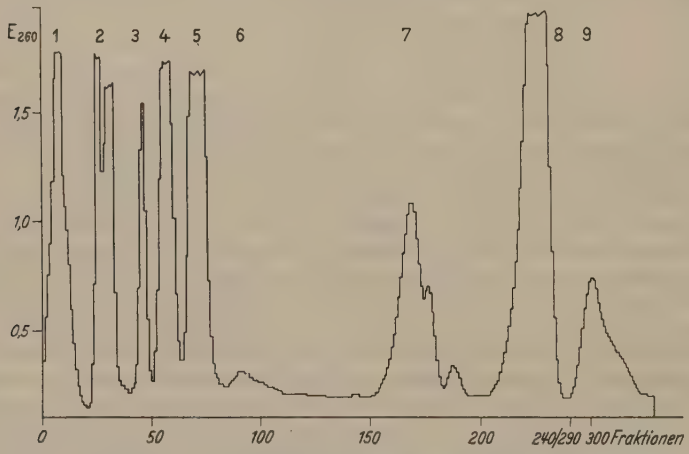


Abb. 1. Ionenaustausch-Chromatogramm des säurelöslichen Extraktes aus Rattengehirn (SI). Dowex 1 × 10, Formiat, Säule 1 × 10 cm. Mischgefäß 250 cm³. Elutionsflüssigkeit: 1—140 4 n HCOOH; 141—265 4 n HCOOH + 0,2 m $HCOONH_4$; 266—Ende 4 n HCOOH + 0,4 m $HCOONH_4$

luftgefüllte tote Räume zu vermeiden, und um ein völlig dichtes Abschließen der Spritzenstempel zu erreichen, erwies es sich als zweckmäßig, den mechanischen Druck über eine Paraffinölschicht auf die Säure zu übertragen. Die Apparatur wurde so dimensioniert, daß in einer Stunde 20 cm³ Elutionsmittel den Säulenquerschnitt von 1 cm² passierten. Durch die Entwicklung eines Zusatzgerätes, das kontinuierlich die UV-Absorption des Eluates registriert, konnte die Beobachtung des Fortganges der Chromatographie sehr erleichtert werden. Das Prinzip der Konstruktion, die für vergleichende Untersuchungen zum gleichzeitigen Betrieb von 2 Säulen eingerichtet ist, kann aus der Skizze (Abb. 2) ersehen werden.

3. Isolierung der Nucleotide aus den Säuleneluaten. Die Entfernung der Ameisensäure aus den Eluaten gelang relativ einfach durch Gefriertrocknung. Wesentliche Schwierigkeiten bereitete jedoch die Abtrennung des Ammoniumformiates. Sie ließ sich zwar durch eine Vakuumsublimation des Salzes bei niedriger Temperatur und einem Druck von

etwa 10^{-3} mm Hg durchführen. Dieses Verfahren war jedoch außerordentlich zeitraubend und stets mit erheblichen Verlusten an Nucleotiden verbunden. Das Verschwinden der Substanz beruht wahrscheinlich darauf, daß beim Absublimieren der Salzpartikelchen kleinste Teilchen der in sehr feiner Verteilung abgeschiedenen Substanz mitgetragen werden. Alle Versuche, die Nucleotide durch Adsorption an Aluminiumoxyd oder Kohle oder Papierpulver von dem sie begleitenden Elutionsmittel abzutrennen, scheiterten an der ungenügenden Wiedergewinnung

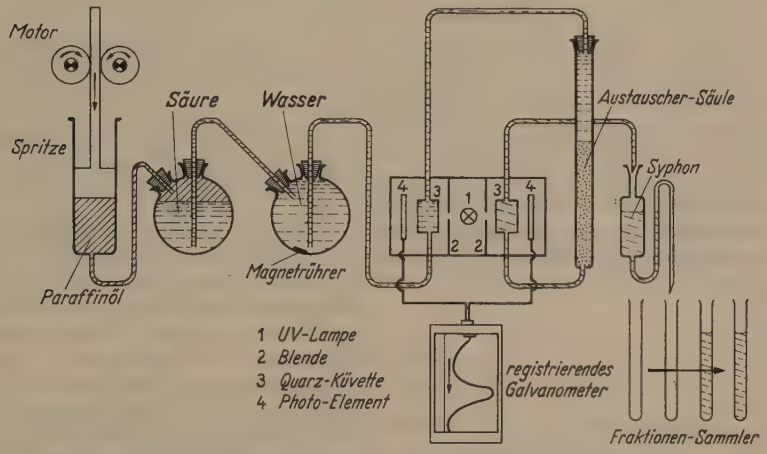


Abb. 2. Schema der Apparatur zur Ionenaustausch-Chromatographie

der adsorbierten Substanzen. Die Entfernung der Begleitstoffe gelang schließlich auf folgende Weise: Absublimieren der Hauptmenge der Ameisensäure in der Gefriertrocknungsapparatur; Behandlung des mit Wasser verdünnten Rückstandes mit einem stark sauren, H^+-beladenen Kationenaustauscher, bis kein NH_4-Ion in der Lösung mehr nachweisbar ist; Elution des Austauschers mit Wasser und erneute Gefriertrocknung des Eluates unter Zusatz einiger Tropfen reinen Glycerins zur Vermeidung von Sublimationsverlusten.

4. Papierchromatographie der Nucleotide. Bei einigen besonders labilen Substanzen, z. B. den UDP-Zuckerverbindungen, die nur in relativ kleiner Konzentration vorhanden sind, erwies es sich als zweckmäßig, die weitere Reinigung nach der Elution von der Säule durch Papierchromatographie vorzunehmen. Hierzu wurde Whatman-Papier Nr. 1 und nebeneinander, bei einigen Chromatogrammen nacheinander, ein alkalisches und ein saures Lösungsmittelsystem folgender Zusammensetzung benutzt:

Essigester — Pyridin — Wasser 2 : 1 : 2 (Jermyn u. Isherwood), Buttersäure — Ammoniak 25%ig — Wasser 57 : 4 : 39 (Wyatt). Mit diesen beiden Systemen lassen sich sowohl die Nucleotide als auch die hydrolytisch von ihnen abgetrennten Hexosen chromatographieren. Die Lokalisierung der getrennten Verbindungen erfolgte bei den Nucleotiden durch das Photoprint-Verfahren nach

Markham u. Smith und bei den verschiedenen Zuckern durch Besprühen mit Reagentien, die bei den einzelnen Chromatogrammen jeweils angegeben sind.

5. Methoden zur Identifizierung der Nucleotide. Die Identifizierung der isolierten Nucleotide erfolgte bei allen Substanzen nach dem gleichen Prinzip: Aufnahme der UV-Spektren in saurer und alkalischer Lösung; Bestimmung von Phosphat nach vorangegangener Veraschung; Bestimmung des Gehaltes an Ribose und Berechnung des Verhältnisses von Base : Ribose : Phosphat; Identifizierung der freien Basen nach Hydrolyse durch Säulen- oder Papierchromatographie und Aufnahme der UV-Spektren der Basen in saurer und alkalischer Lösung.

Die Phosphatbestimmung erfolgte nach dem Verfahren von Berenblum u. Chain nach saurer Veraschung mit konz. H_2SO_4 und $HClO_4$, den Angaben von Fleckenstein u. Janke entsprechend.

Die Messung des Ribosegehaltes geschah nach Mejbaum in der Modifikation von Barnum mit AMP als Bezugssubstanz. Mit dieser Methode erhält man bei den Purinverbindungen einwandfreie Ergebnisse, während die Werte bei den Pyrimidinderivaten viel zu niedrig sind. Bei einigen Uridinverbindungen wurde darum die Ribose durch Perjodat-Oxydation nach Dixon u. Lipkin bestimmt. Dieses elegante Verfahren gibt aber nur bei völliger Abwesenheit von Formiat und weitgehender chromatographischer Reinigung der Nucleotide gute Resultate.

6. Charakterisierung der Basen. Die zur Identifizierung notwendige Abtrennung der Basen erfolgte stets durch Hydrolyse mit konz. $HClO_4$ bei 100° C nach Marshak u. Vogel. Dabei entstehen häufig stark gefärbte Lösungen, wahrscheinlich durch oxydative Veränderungen undefinierter Beimengungen. Diese Verunreinigungen, die sowohl die Aufnahme der UV-Spektren als auch die papierchromatographische Trennung empfindlich stören, lassen sich leicht entfernen durch Adsorption der Basen aus alkalischer Lösung an einen Anionen-Austauscher. Nach dem Auswaschen der störenden Substanzen mit Wasser werden die Basen mit n/10 HCl eluiert. Handelt es sich nur um eine einzelne Base, kann sogleich das UV-Spektrum aufgenommen werden, liegt ein Gemisch mehrerer Basen vor, wird die weitere Trennung unmittelbar angeschlossen. Diese kann papierchromatographisch erfolgen, wenn im Gemisch etwa gleiche Mengen der einzelnen Basen vorhanden sind. Bei Konzentrationsunterschieden von mehr als einer Zehnerpotenz lassen sich einwandfreie Differenzierungen nur mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie erreichen.

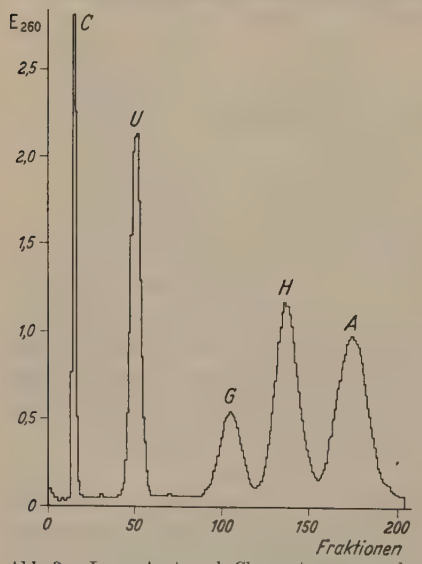


Abb. 3. Ionen-Austausch-Chromatogramm der freien Basen. *C* Cytosin, *U* Uracil, *G* Guanin, *H* Hypoxanthin, *A* Adenin. Dowex 1 × 10, Chlorid. Säule 1 × 10 cm; Mischgefäß: 400 cm³ 0,2 n NH_3 + 0,025 m NH_4Cl. Elutionsflüssigkeit: 1—Ende 0,2 n NH_3 + 0,1 m NH_4Cl

Da alle im tierischen Organismus vorkommenden Purin- und Pyrimidinbasen amphoter reagieren, können sie sowohl an einem Kationen-, wie auch an einem Anionenaustauscher chromatographiert werden. Es

gelang eine von Cohn (1949) beschriebene, diskontinuierlich verlaufende Anionenaustauschchromatographie zu einer kontinuierlich verlaufenden mit Gradientenelution umzugestalten, mit der sich alle im Rattengehirn vorkommenden Purin- und Pyrimidinbasen in einem Arbeitsgang trennen ließen. Die Arbeitsweise entspricht dem bei der Nucleotidchromatographie angegebenen Verfahren. Die weiteren Einzelheiten sind der Legende zur Abb. 3 zu entnehmen, in der ein entsprechendes Basenchromatogramm wiedergegeben ist.

Die Papierchromatographie der Basen erfolgte in der von Barrollier beschriebenen Anordnung zwischen Folien. Es wurde stets zweidimensional auf Whatman-Papier Nr. 1, in beiden Richtungen aufsteigend chromatographiert, in der ersten Richtung mit Isopropanol —HCl (35%ig) — Wasser 170 : 41 : 39, in der zweiten Richtung mit Butanol—Ammoniak (25%ig) 86 : 14 nach Wyatt. Die Darstellung der Flecken erfolgte nach dem Photoprint-Verfahren von Markham u. Smith. Bei dieser Arbeitsweise trennten sich die Basen völlig von ihren Verunreinigungen und ihre Lage im Chromatogramm erlaubte bereits eine hinreichende Identifizierung. Die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren erfolgte mit einem Beckman-Spektralphotometer im Wellenlängenbereich von 220—300 mμ in n/10 HCl und n/10 NaOH. Dazu wurden entweder die Säulen-Eluate nach Entfernung von Ameisensäure und Ammonium-Formiat benutzt oder die Substanzen aus den Papierchromatogrammen mit n/10 HCl eluiert.

Ergebnisse

Identifizierung der Nucleotide des Rattengehirns

Die nach der Trennung in S I erhaltenen neun Banden wurden, soweit es sich als notwendig erwies, vor der weiteren Identifizierung einer Rechromatographie in S II unterworfen. Bei den daran anschließenden analytischen Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

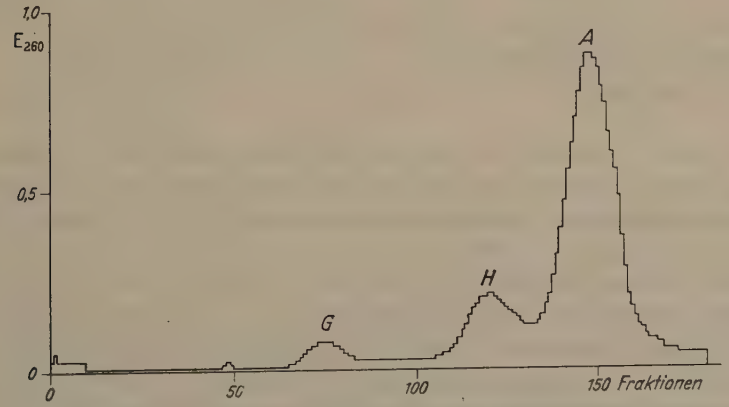


Abb. 4. Ionenaustausch-Chromatogramm der Basen von Bande 1. Methodische Angaben s. Abb. 3

Die erste Bande enthält die Bestandteile des Gehirn-Extraktes, die vom Austauscher nicht festgehalten werden. Sie besitzen demnach bei

neutralem bis schwach saurem p_H keine anionischen Eigenschaften und können daher auch nicht rechromatographiert werden. Die papierchromatographische Untersuchung und die Basenbestimmung durch eine Austausch-Chromatographie zeigte, daß nur etwa 35% der UV-Absorption dieser Bande durch Nucleobasen bedingt ist. Unter diesen Basen macht Adenin die Hauptmenge mit 80% aus, daneben findet man etwa 15% Hypoxanthin und eine kleine Menge Guanin; Uracil und Cytosin lassen sich nicht nachweisen (Abb. 4). Das gesamte Adenin ist an Ribose gebunden. Daraus ergibt sich, daß in Bande 1 neben einer großen Menge undefinierter UV-absorbierender Verbindungen im wesentlichen Adenosin enthalten ist.

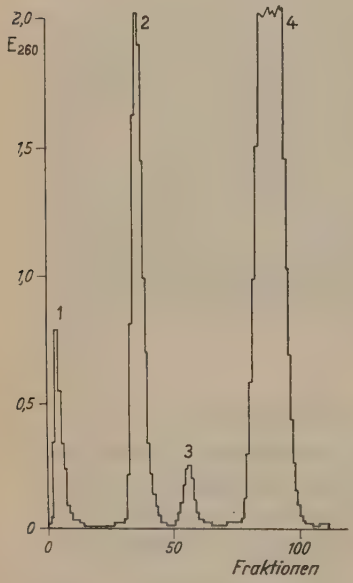


Abb. 5. Rechromatogramm der Bande 2 (SII). Dowex 1 × 10, Formiat, Säule: 20 × 1 cm, Mischgefäß: 500 cm³, Elutionsmittel: 1—15 H_2O, 16—Ende 0,5 m $HCOONH_4$

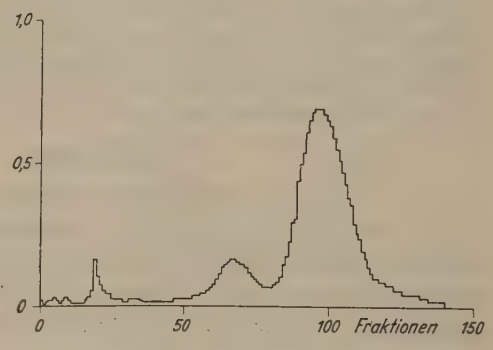


Abb. 6. Rechromatogramm der Bande 3 (SII). Methodische Einzelheiten s. bei Abb. 5. Elutionsmittel: 1—Ende 1 m $HCOONH_4$

Die Bande 2 trennt sich nach der Rechromatographie in 4 Banden (Abb. 5), von denen die erste mit Wasser eluiert wird. Sie besteht entweder aus einem in S I nicht völlig abgetrennten Teil der Bande 1 des Hauptchromatogramms oder aus Substanzen, die bei der Aufarbeitung der Bande 2 durch Spaltung der Nucleotide entstanden sind. Die zweite Substanz verhält sich im Papierchromatogramm sowie nach Reaktion mit KCN nach Colowick, Kaplan u. Ciotti wie DPN. Die Base zeigt das Spektrum des Adenins. Das molare Verhältnis von Base : Ribose : Phosphat ergibt nicht ganz den bei DPN zu erwartenden theoretischen Wert von 1 : 2 : 2. Die Relation betrug 1 : 1,5 : 1,6, bei Berücksichtigung der höheren spezifischen Extinktion des Adenins im Verband des DPN. Die dritte Verbindung wurde nicht identifiziert. Ihr Spektrum ergab

jedoch keinen Anhalt für das Vorhandensein von Harnsäure oder Cytosin-Verbindungen. Um sicher nachzuweisen, daß in den ersten Banden des Hauptchromatogramms keine Cytosinderivate übersehen worden sind, wurde ein Extrakt von 40 Rattengehirnen mit Perchlorsäure hydrolysiert und die Basen säulenchromatographisch getrennt. Der Vorlauf dieses Chromatogramms und das an der für Cytosin typischen Stelle erhaltene Eluat wurde papierchromatographisch auf Cytosin untersucht. In keinem dieser Versuche konnte Cytosin gefunden werden.

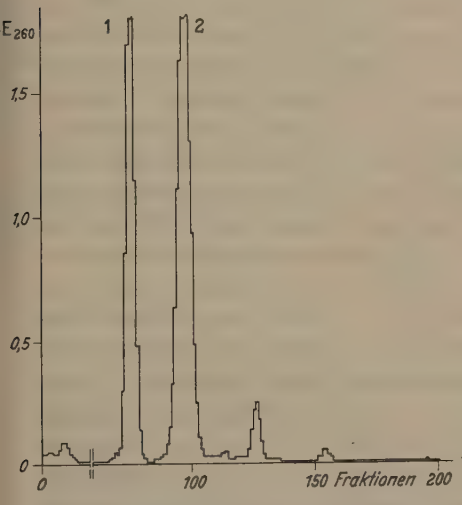


Abb. 7. Rechromatogramm der Bande 4 (SII). Methodische Einzelheiten s. bei Abb. 5, Elutionsmittel: 1—100 0,5 m $HCOONH_4$; 101—Ende 1 m $HCOONH_4$

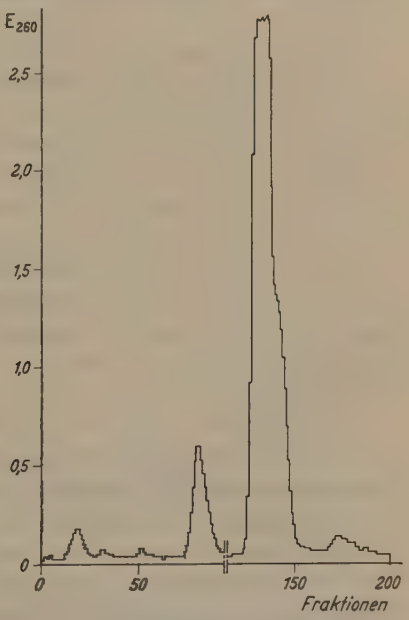


Abb. 8. Rechromatogramm der Bande 5 (SII). Methodische Einzelheiten s. bei Abb. 5, Elutionsmittel: 1—100 1 m $HCOONH_4$; 101—Ende 2m $HCOONH_4$

Die vierte Substanz wurde eindeutig als Adenosinmonophosphat erkannt. Adenin : Ribose : Phosphat verhalten sich zueinander wie 1 : 1 : 1.

Die Bande 3 erschien sowohl im Rechromatogramm als auch bei der Papierchromatographie weitgehend einheitlich. Bei der Rechromatographie größerer Mengen trennte sich noch eine weitere Verbindung ab (Abb. 6). Bei dieser handelt es sich wahrscheinlich um Triphosphopyridinnucleotid, wie H. Coper durch vergleichende Papierchromatographie feststellen konnte. Die Hauptmenge enthielt als Base Guanin in der molaren Relation zu Ribose und Phosphat von 1 : 1 : 1. Der Hauptteil der Bande 3 besteht daher aus Guanosinmonophosphat.

Die Bande 4 trennt sich bei der Rechromatographie in zwei gleich starke Fraktionen (Abb. 7). Die Base der ersten Verbindung wurde nach Lage im Papierchromatogramm und nach ihrem Spektrum als Uracil, die der zweiten als Hypoxanthin erkannt. Das molare Verhältnis von Base zu Phosphat ist bei der ersten Substanz 1 : 1. Der Ribose-Anteil betrug bei der Bestimmung mit Orcin nur 0,2 Mol. Wie bereits erwähnt, liefert diese Methode bei der Untersuchung von Pyrimidinribosiden keine quantitativen Ergebnisse. Die zweite Substanz enthielt Base, Ribose und Phosphat im Verhältnis von 1 : 1 : 1. Die Bande 4 besteht somit aus Uridin- und Inosinmonophosphat.

Die Bande 5, die in S I einheitlich erscheint, läßt bei der Rechromatographie neben der Hauptmenge weitere kleine Fraktionen erkennen (Abb. 8). Die bisher erhaltenen Mengen dieser Substanzen sowie der Substanzen *der Bande 6*, die sich in S I nicht immer völlig von Bande 5 abtrennen lassen, sind für eine einwandfreie Identifizierung zu gering. Vermutlich enthalten die Bande 5 und 6 die Flavin-Adeninnucleotide, die von anderen Autoren ohne nähere Angaben über die Identifizierung an dieser Stelle des Chromatogrammes lokalisiert wurden. Der Hauptanteil der Bande 5 enthält als Base Adenin im Verhältnis zu Ribose und Phosphat von 1 : 1 : 2 und besteht somit aus Adenosindiphosphat.

Die 7. Bande stellte sich ursprünglich, obgleich sie mehrere Substanzen enthält, als eine einheitliche Bande im Chromatogramm dar. Mit zunehmender Verfeinerung der Methode gelang bereits in S I die Auftrennung in 3 Fraktionen. Da sich diese im Papierchromatogramm als weitgehend einheitlich erwiesen, wurde auf eine Rechromatographie vor der Identifizierung verzichtet. Die Base der ersten beiden Fraktionen verhielt sich auf dem Papierchromatogramm und bei der Prüfung im Spektralphotometer wie Uracil, die der dritten Fraktion wie Guanin. Die Uracilverbindungen der ersten beiden Fraktionen lassen sich durch Hydrolyse mit n/100 HCl während 20 min in ein Gemisch von Uridinmono- und -di-phosphat überführen. Diese wurden papierchromatographisch getrennt und durch Bestimmung von Base, Ribose und Phosphat identifiziert. Die Ribose wurde durch Oxydation mit Perjodat quantitativ erfaßt. Auf dem gleichen Papierbogen, auf dem die Nucleotide chromatographiert wurden, gelang bei der ersten Fraktion der Nachweis von N-Acetyl-glucosamin durch Besprühen mit Dimethylaminobenzaldehyd nach Morgan-Elson und von Glucose durch Besprühen mit Anilinphthalat nach Partridge bei der zweiten Fraktion. Galactose wurde nicht gefunden, obwohl bei einem zum Vergleich aufgetragenen Gemisch von Glucose und Galactose beide Verbindungen voneinander getrennt nachgewiesen werden konnten. Bei der dritten Fraktion ergab die Analyse ein Verhältnis von Guanin zu Ribose und Phosphat wie

1 : 1 : 2. Die Bande 7 enthält somit in der Reihenfolge der Elution in S I Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin, Uridindiphosphat-Glucose und Guanosindiphosphat.

Die Bande 8, die in S I völlig einheitlich erschien, trennte sich bei der Rechromatographie in eine Hauptfraktion und 4 weitere Fraktionen (Abb. 9). Die Identifizierung der ersten Fraktion gelang nicht. Die Base der zweiten Fraktion ist Uracil, die der dritten, vierten und fünften ist Adenin. Auf ein Mol Base kommt bei allen Fraktionen jeweils ein Mol Ribose, bei der zweiten Fraktion mit Perjodat bestimmt, bei den übrigen mit Orcin gemessen. Fraktion 2 u. 3 enthalten 2 Mole Phosphat, die beiden letzten Fraktionen 3 Mole Phosphat auf 1 Mol Base und Ribose. Demnach besteht die Hauptmenge der Bande 8 aus Adenosintriphosphat. Außerdem enthält sie Uridindiphosphat und eine kleine Menge einer Verbindung mit der Summenformel des Adenosintriphosphates. Die Trennung von ATP am Ionenaustauscher in zwei Banden gleicher summarischer Zusammensetzung wurde mehrfach sowohl bei der Chromatographie in S I als auch in S II beobachtet. Es konnte bis jetzt nicht entschieden werden, ob Isomere des ATP existieren oder ob dieser Erscheinung andere Ursachen zugrunde liegen. Das in der dritten Fraktion enthaltene Adenosindiphosphat ist durch Phosphatabspaltung aus ATP bei der Trocknung und Entfernung des Ammoniumformiats entstanden. Es macht etwa 4% des ATP aus. Die Gesamtmenge der Bande 8 wurde nach Entfernung des Elutionsmittels der S I Chromatographie auf das Vorhandensein von Glucuronsäure untersucht. Es konnte sowohl mit der Carbazol-Methode nach Dische als auch mit Naphthoresorcin nach Fishman u. Green Glucuronsäure nachgewiesen werden. Nach der Rechromatographie war jedoch die Substanz in keiner der fünf Fraktionen mehr zu finden. Man muß daher annehmen, daß in Bande 8 auch eine kleine Menge Uridindiphosphat-Glucuronsäure vorhanden ist, diese Verbindung jedoch bei der Vorbereitung zur Rechromatographie gespalten wird. Der eindeutige

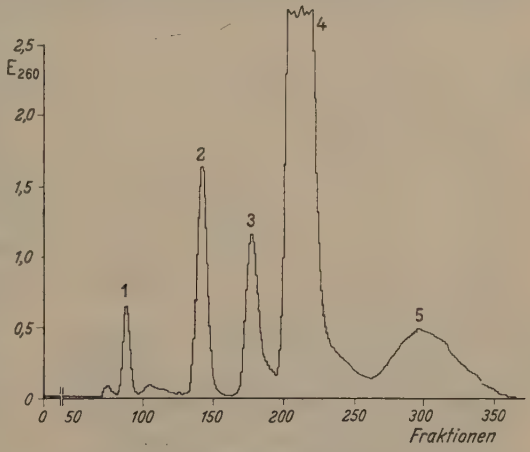


Abb. 9. Rechromatogramm der Bande 8 (S II). Methodische Einzelheiten s. bei Abb. 5, Elutionsmittel 1—160 lm $HCOONH_4$; 161—365 2 m $HCOONH_4$; 366—Ende 2 m $HCOONH_4$ + 0,75 n HCOOH

Nachweis dieser Substanz muß einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Die Bande 9 läßt bereits in S I erkennen, daß sie mindestens zwei Substanzen enthält. Im Rechromatogramm trennt sie sich in drei Fraktionen (Abb. 10). In der ersten wurde als Base Uracil nachgewiesen sowie mit Orcin 0,2 Mol Ribose bestimmt und 3 Mole Phosphat gefunden. Diese Substanz ist demnach Uridintriphosphat. Die beiden anderen Fraktionen enthielten Guaninverbindungen mit je einem Mol Ribose pro Mol Base. In der zweiten kamen 2 Mole Phosphat, in der dritten 3 Mole Phosphat auf je 1 Mol Base und Ribose. Es handelt sich also bei der Guaninverbindung der Bande 9 um Guanosintriphosphat, das bei der Vorbereitung zur Rechromatographie zu einem beachtlichen Teil in GDP und Phosphat gespalten wird.

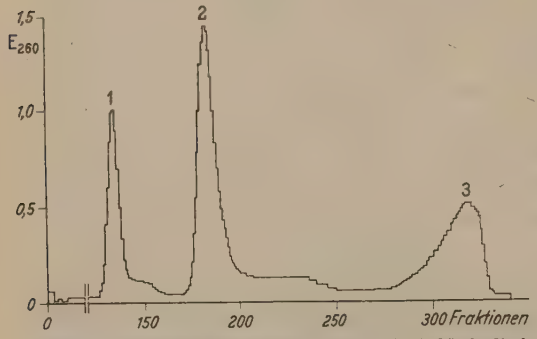


Abb. 10. Rechromatogramm der Bande 9 (S II). Methodische Einzelheiten s. bei Abb. 5, Elutionsmittel 1—95 1 m $HCOONH_4$; 96—200 1,5 m $HCOONH_4$; 201—240 2 m $HCOONH_4$; 241—Ende 2 m $HCOONH_4$ + 0,75 n HCOOH

Die folgende Tab. 1 enthält eine Zusammenfassung der analytischen Daten der Verbindungen, deren Identifizierung genügend gesichert erscheint und deren Vorkommen im Gehirn damit nachgewiesen ist.

Quantitative Bestimmung der einzelnen Nucleotide des Rattengehirns

Die beabsichtigten weiteren Arbeiten über die Beteiligung der Nucleotide an Funktionsänderungen des Zentralnervensystems setzten Kenntnisse nicht nur der Art der einzelnen Nucleotide, sondern auch ihrer Konzentration im Zentralnervensystem voraus. Nachdem der größte Teil der in den Chromatographien isolierten Nucleotide des Rattengehirnes identifiziert werden konnte, war es möglich, aus der jeweils gemessenen UV-Absorption unter Benutzung der spezifischen Extinktionskoeffizienten die Mengen zu berechnen.

Dabei ergab sich, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, die Notwendigkeit, die Resultate der Absorptionsmessung auf eine bestimmte Einheit zu beziehen. Man kann hierzu die Frischgewichte der Gehirne benutzen. Diese zeigen bei Tieren mit einem Gewicht von 120—160 g sehr geringe Abweichungen voneinander. Das Gewicht eines Gehirnes beträgt nach ausgedehnten Versuchen von Neubert u. Müller im Mittel 1,5 g $\pm$ 0,1 g. Unter den besonderen experimentellen Bedingungen

war es jedoch nicht möglich, die Gehirne sofort nach der Entnahme zu wiegen. Nachdem sich im Verlauf der Versuche gezeigt hat, daß der Stickstoffgehalt des säurelöslichen Nervengewebes weitgehend konstant ist und in einer festen Relation zum Feucht- und Trockengewicht des Gehirns steht, wurden die Werte aller Nucleotidbestimmungen auf den

Tabelle 1. *Analytische Daten der in den Banden 1—9 identifizierten Nucleotide*

Bande Nr.	Base	Molares Verhältnis von Base : Ribose : Phosphat			Nucleotid	Bemerkungen
1	A	1,00	1,00	—	Adenosin	
2	A	1,00	1,5	1,6	DPN	Nachgewiesen durch Reaktion mit KCN
	A	1,00	1,03	1,14	AMP	
3	G	1,00	1,02	1,29	GMP	
4	U	1,00	0,21	1,11	UMP	
	H	1,00	1,25	1,14	IMP	
5	A	1,00	1,18	1,89	ADP	
6		nicht identifiziert				Wahrscheinlich Verbindung FAD-Gruppe
7	U	1,00	—	1,82	UDPAG	Enthält N-Acetylglucosamin
	U	1,00	1,12[1]	1,96	UDPG	Enthält Glucose
	G	1,00	1,08	1,93	GDP	
8	A	1,00	1,06	3,00	ATP	Enthält Glucuronsäure
	U	1,00	1,14[1]	2,00	UDP	
9	U	1,00	0,48	3,08	UTP	
	G	1,00	1,14	3,02	GTP	

A = Adenin; G = Guanin; H = Hypoxanthin; U = Uracil.

[1] Ribose mit Perjodat bestimmt.

gleichzeitig nach KJELDAHL gemessenen N-Gehalt des Säure-extrahierten Gehirnes bezogen. Dieser betrug im Mittel 22,7 ± 2,0 mg pro Gehirn.

Zu den berechneten Werten (Tab. 2) ist noch folgendes zu bemerken:

Bei der 1. Bande sind, wie bereits erwähnt, nur 35% der gemessenen Extinktion durch die Lichtabsorption der Nucleobasen bedingt, während der übrige Anteil der Absorption durch undefinierte Begleitsubstanzen bewirkt wird. Aus diesem Grunde wurde nur ein Drittel der gemessenen Extinktion der Berechnung des Nucleotid-Gehaltes zugrunde gelegt. Davon entfallen 80% auf Adenosin und 15% auf Inosin.

Da bei der 2. Bande in S I eine völlige Trennung von DPN und AMP nicht immer gelingt und bei der Vorbereitung des Eluates für eine Chromatographie in S II Verluste an DPN entstehen, wurde auf eine

Trennung der beiden Substanzen zur Bestimmung verzichtet und der DPN-Gehalt im Gemisch nach der Methode von Colowick, Kaplan u. Ciotti ermittelt. Aus dem Ergebnis dieser Messung wurde die Extinktion des DPN bei 260 mμ berechnet und von der Gesamtextinktion abgezogen. Die Extinktionsdifferenz entsprach dann dem AMP-Gehalt.

Bei der Berechnung des GMP wurde die im Rechromatogramm sich darstellende geringe Menge einer anderen Substanz nicht berücksichtigt.

Die Bestimmung von IMP und UMP erfolgte nach der Trennung im Rechromatogramm.

Der ADP-Gehalt wurde aus der Extinktion der Bande 5 berechnet ohne Berücksichtigung der nicht abgetrennten Substanzen der FAD-Gruppe. Ihr Anteil an der Lichtabsorption ist so gering, daß er ohne wesentlichen Fehler vernachlässigt werden kann.

Tabelle 2. *Nucleotid-Gehalt des Gehirns normaler Ratten*

Nucleotid	Mol/g N	Mol/g Gehirn (Trockengewicht)
Adenosin	$4{,}9 \cdot 10^{-6}$	$3{,}8 \cdot 10^{-7}$
DPN	$2{,}4 \cdot 10^{-6}$	$1{,}9 \cdot 10^{-7}$
AMP	$3{,}4 \cdot 10^{-5}$	$2{,}6 \cdot 10^{-6}$
ADP	$3{,}6 \cdot 10^{-5}$	$2{,}8 \cdot 10^{-6}$
ATP	$4{,}0 \cdot 10^{-5}$	$3{,}1 \cdot 10^{-6}$
GMP	$5{,}4 \cdot 10^{-6}$	$4{,}2 \cdot 10^{-7}$
GDP	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$	$1{,}0 \cdot 10^{-6}$
GTP	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$
IMP	$5{,}3 \cdot 10^{-6}$	$4{,}1 \cdot 10^{-7}$
UMP	$3{,}6 \cdot 10^{-6}$	$2{,}8 \cdot 10^{-7}$
UDP	$2{,}1 \cdot 10^{-6}$	$1{,}6 \cdot 10^{-7}$
UDP AG	$3{,}1 \cdot 10^{-6}$	$2{,}4 \cdot 10^{-7}$
UDP G	$3{,}1 \cdot 10^{-6}$	$2{,}4 \cdot 10^{-7}$
UTP	$4{,}5 \cdot 10^{-6}$	$3{,}5 \cdot 10^{-7}$
		$13{,}5 \cdot 10^{-6}$

Die angegebene Menge des ATP ist die Summe der in Bande 8 enthaltenen Adenin-Verbindungen ohne Rücksicht darauf, daß in S II eine Auftrennung in ADP und zwei ATP-Fraktionen erfolgt.

Der Uracil-Anteil der 8. Bande wurde als UDP angegeben, ungeachtet, daß in dieser Bande sowohl UDP und sehr wahrscheinlich auch UDP-Glucuronsäure enthalten sind.

Diskussion

Die analytische Untersuchung hat gezeigt, daß im Gehirn ebenso wie in der Leber und in verschiedenen anderen Organen eine große Zahl säurelöslicher Nucleotide enthalten ist. Aber bereits die qualitative Feststellung des Vorhandenseins oder des Fehlens einiger in anderen Organen vorkommender Verbindungen scheint charakteristische Eigenheiten des Nervengewebes aufzudecken und wirft damit einige Fragen auf.

Es war zunächst überraschend, daß im Gehirn-Extrakt keine Cytosin-Verbindungen gefunden werden konnten, nachdem Schmitz, Potter, Hurlbert u. White glauben, ihr Vorkommen nachgewiesen zu haben.

Allerdings liefert das von diesen Untersuchern demonstrierte Chromatogramm keinen eindeutigen Beweis hierfür.

Die biologische Bedeutung bestimmter Cytosinverbindungen ist in neuerer Zeit von verschiedenen Autoren erkannt worden. Nach KENNEDY u. WEISS (1955 und 1956) und nach WILLIAMS-ASHMAN u. BANKS ist Cytidindiphosphat mit Cholin zu Cytidindiphosphatcholin verbunden die prosthetische Gruppe eines Fermentes, das bei der Lecithinsynthese die Übertragung des Phosphorylcholins auf das Fettsäureglycerid katalysiert. Außerdem haben BADDILEY, BUCHANAN, CARSS, MATHIAS u. SANDERSON in Bakterien Cytidindiphosphatglycerin und Cytidindiphosphatribitol nachgewiesen und glauben, daß die Glycerinverbindung ebenfalls bei der Bildung von Lipoiden eine Funktion besitzt.

Obgleich das Gehirn der Ort der größten Lipoidkonzentration des Körpers ist, lassen sich die zu bestimmten Reaktionen bei der Biosynthese von Lipoiden offenbar notwendigen Cytosinderivate im Zentralnervensystem nicht nachweisen. Man kann daraus schließen, daß die Synthese der Lipoide an anderen Orten stattfindet oder, daß der Weg der Synthese über diese Substanzen im Zentralnervensystem keine Bedeutung besitzt.

Es fällt auf, daß unter den Monophosphaten auch Inosinmonophosphat vorkommt, während bei den Di- und Triphosphaten die entsprechenden Inosinverbindungen nicht zu finden sind.

Die Arbeiten zahlreicher Autoren (s. CARTER) haben gezeigt, daß sich eine beachtliche Menge der im Organismus vorhandenen Nucleotide aus einfachen Bausteinen bildet. Bei den Purinnucleotiden verläuft diese Synthese über Inosinmonophosphat, das durch weitere Aminierung in Adenin- und Guanin-Derivate umgewandelt wird. Diese Stickstoffübertragung scheint nur auf der Stufe der Monophosphate möglich zu sein. Es ist weiterhin bekannt, daß im Gehirn stets ein bestimmter Gehalt an freiem Ammoniak vorhanden ist, der beim Erregungsstoffwechsel erheblich ansteigt. Wenn auch bis heute noch nicht entschieden ist, ob dieser Ammoniak im wesentlichen dem System Glutamin-Glutaminsäure entstammt (MCILWAIN, WLADIMIROW) oder durch Adenindesaminierung gebildet wird (RICHTER u. DAWSON, WEIL-MALHERBE), so muß man doch auch die letztgenannte Reaktion als Ursache für das Vorhandensein von Inosinmonophosphat in Betracht ziehen. Ebenso wie die Anlagerung der Aminogruppe erfolgt ihre Abspaltung offenbar auf der Monophosphatstufe. Zwar ist nach Angaben von DEUTSCH u. NILSON eine Desaminierung auch auf der Diphosphatstufe möglich. Das entsprechende Ferment scheint jedoch nur im quergestreiften Muskel nicht aber im Zentralnervensystem vorhanden zu sein.

Das isolierte Auftreten von Inosinmonophosphat im Gehirn und die zitierten Befunde stützen daher die Ansicht, daß die Inosinverbindungen im Zentralnervensystem nicht durch Bindung und Übertragung von energiereichen Phosphat am Energiestoffwechsel teilnehmen, sondern daß Inosinmonophosphat nur Durchgangsstufe bei der Synthese und bei der Degradierung von Purinnucleotiden ist.

Aus den dargelegten Befunden ist weiterhin zu entnehmen, daß im Gehirn ebenso wie in der Leber die von CABIB, LELOIR, CARDINI; CAPUTTO, LELOIR, CARDINI, PALADINI; DUTTON u. STOREY; STOREY u.

Dutton; Smith u. Mills beschriebenen Uridindiphosphat-Zuckerverbindungen vorkommen, die im Skelet- und Herzmuskel nicht oder nur in verschwindend kleiner Menge vorhanden sind. Die Autoren haben demonstriert, daß in der Leber eine Uridindiphosphat-Glucoseverbindung entsteht und die Glucose in dieser Bindung zu Glucuronsäure oxydiert wird. Diese Uridindiphosphatglucuronsäure ist die prosthetische Gruppe eines in der Leber vorkommenden Fermentes, das Glucuronsäure auf Alkohole, Phenole und andere Verbindungen überträgt und somit eine Entgiftungsfunktion ausübt. In neuerer Zeit gelang es Strominger, Maxwell, Axelrod u. Kalckar, die für die einzelnen Reaktionsschritte notwendigen Fermente in den verschiedenen Elementen der Leberzelle zu lokalisieren, sie zu isolieren und die Reaktion in vitro zu studieren.

Mit der Auffindung der prosthetischen Gruppen dieser Fermente im Zentralnervensystem stellt sich die Frage, ob auch das Nervengewebe die Fähigkeit besitzt, wie die Leber Glucuronsäure zu bilden und zu übertragen. Ihre Beantwortung gewinnt an Bedeutung durch die Erkenntnis, daß die im Nervensystem so wirksamen Catecholamine im Verlauf ihrer Inaktivierung mit Glucuronsäure gepaart werden (Axelrod). Auch eine Anzahl neurotroper Arzneimittel, die phenolische Hydroxylgruppen besitzen, sind als Substrate der Glucuronsäuretranspherase erkannt worden. Die Entscheidung, ob diese Entgiftungsreaktion auch im Gehirn abläuft und ob sich hier möglicherweise Zusammenhänge mit der Ausbildung von Gewöhnungserscheinungen, etwa an Morphin, finden lassen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die im zweiten Teil der Arbeit aufgeführten quantitativen Ergebnisse bedürfen ebenfalls einiger Bemerkungen.

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus mehreren Chromatographien. Die Anzahl der Einzelbestimmungen variiert jedoch von Substanz zu Substanz. Im Verlauf der Experimente wurden mehrfach Abwandlungen des Elutionsverfahrens vorgenommen, durch die sich jeweils geringe Änderungen in der Zusammensetzung der einzelnen Banden ergaben. Aus diesen Gründen scheint es verfrüht, bei den Konzentrationsangaben mit Hilfe von statistischen Berechnungen einen Streuungsbereich abzugrenzen.

Die Diskussion der Frage, ob die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie und der anderen Verfahren den Konzentrationen der einzelnen Substanzen im Zentralnervensystem quantitativ entsprechen, bereitet einige Schwierigkeiten.

Zunächst ist dem Einwand zu begegnen, ein Teil der Nucleotide ginge während der Chromatographie verloren (Marian, Bennett u. Krueckel) Diese Feststellung beruht auf der Messung der UV-Absorption und der

Radioaktivität markierter Nucleotidmoleküle, ohne daß eine Identifizierung der vor der Chromatographie vorhandenen und danach fehlenden Substanzen erfolgte.

Ist diese Identifizierung nicht möglich, so kann der Nachweis, daß der Verlust tatsächlich die Nucleotide betrifft, nur durch die spezifische quantitative Erfassung eines allen Nucleotiden gemeinsamen Bestandteiles vor und nach der Chromatographie erbracht werden. Hierzu können der Zuckeranteil und die Phosphorsäure nicht benutzt werden, da im Verlauf der Chromatographie erhebliche Mengen an Zucker- und Phosphatverbindungen abgetrennt werden, die keine Nucleotidderivate sind. Eine Bilanz dieser Bestandteile kann somit nichts über die quantitative Isolierung der Nucleotide aussagen. Noch weniger ist dazu die Summierung der UV-absorbierenden Stoffe geeignet, da im Gehirn-Extrakt neben den Nucleotiden eine große Menge undefinierter Beimischungen enthalten ist, die im gleichen Spektralbereich wie die Nucleotide UV-Licht absorbieren und die nur zu einem Teil den Austauscher passieren. Ein beachtliches Quantum dieser Stoffe wird bei der Elution an den Austauscher-Partikelchen durch Adsorption festgehalten und entgeht daher der Messung. Eine andere Möglichkeit des Nachweises, daß keine Verluste auftreten, wäre die Isolierung aller Nucleo-Basen und ihre exakte Bestimmung vor und nach der Gesamt-Analyse. Dies scheint jedoch nach dem heutigen Stand der Methoden nur zu gelingen unter Zuhilfenahme des Verfahrens, dessen quantitatives Funktionieren bewiesen werden soll, der Ionenaustausch-Chromatographie selbst.

Bei eigenen Versuchen zur Stützung des benutzten Verfahrens und zur Entkräftung des genannten Einwandes wurde ein Gemisch chromatographisch reiner Adenin-Nucleotide verwendet, deren Bestimmung durch alleinige Messung der UV-Absorption möglich ist. Es hat sich gezeigt, daß diese Substanzen quantitativ vom Austauscher festgehalten und durch Ionenaustausch wieder eluiert werden. Eine Adsorption durch Oberflächenkräfte, wie sie bei einer Anzahl von Stoffen aus dem Gehirnextrakt beobachtet wird, findet offenbar bei den Nucleotiden nicht statt. Unter den Bedingungen, die bei der Chromatographie der Gehirnextrakte eingehalten werden, findet man mehr als 90% der eingesetzten, reinen Nucleotide im Eluat wieder.

Neben diesen experimentellen Befunden, die ein wesentliches Argument für das Funktionieren des gesamten analytischen Verfahrens darstellen, ist der Vergleich der eigenen Resultate mit den Ergebnissen anderer Autoren bedeutungsvoll.

Obgleich an vielen Stellen Untersuchungen über den Nucleotidgehalt der Organe durchgeführt wurden, sind nur wenige Angaben in der Literatur für eine Gegenüberstellung geeignet. In den meisten Fällen war eine völlige Differenzierung

der Substanzen nicht versucht worden. So hat Kerr allerdings beim Hund und nicht bei der Ratte zwischen den Adenin-Nucleotiden und den übrigen Nucleotiden unterschieden, und den Adeninanteil mit 84% der Gesamt-Nucleotidmenge angegeben. Bei der Summierung der Basenanteile der 14 identifizierten Nucleotide machen die Adeninverbindungen etwa 67%, die Guaninverbindungen 19%, die Uracilverbindungen 9% und die Hypoxanthinverbindungen 3% der Gesamtmenge aus. Sehr wahrscheinlich sind in dem von Kerr bestimmten Adeninanteil noch andere Basen enthalten.

In späteren Arbeiten wurde meist das mit Barium- oder Calcium-Ionen fällbare organische Phosphat abgetrennt und in dieser Fraktion zwischen Gesamtphosphat, das der Summe aller Nucleotide entsprechen sollte, und dem leicht hydrolysierbaren Phosphat, mit dem man die Di- und Triphosphate zu erfassen glaubte, differenziert. Unter den bei Mc Ilwain zitierten Arbeiten über den Nucleotidgehalt der Gehirne verschiedener Tierspecies finden sich entsprechende Angaben für die Ratte bei Dawson u.Richter sowie bei Albaum, Teppermann u. Bodanski.

Dawson u. Richter erhalten $4{,}9 \cdot 10^{-6}$ Mole leicht hydrolisierbares Phosphat pro Gramm frisches Gehirn. Berechnet man aus den eigenen Ergebnissen den Pyrophosphatanteil und setzt diesen dem nach Lohmann bestimmten leicht abspaltbaren Phosphat gleich, so kommt man auf etwa $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mol/g Frischgewicht. Dabei wird ein Verhältnis von Trocken- zu Frischgewicht von 1 : 5 zugrunde gelegt, das sich in einer Vielzahl von Versuchen mit großer Konstanz ergeben hat. Unter den Bedingungen nach Lohmann scheint jedoch auch ein beachtlicher Teil der Guanylsäure hydrolysiert zu werden, so daß eine Erhöhung des Wertes bis zu $3{,}3 \cdot 10^{-6}$ Mol/g möglich ist. Aus den Angaben von Albaum, Teppermann u. Bodanski errechnet sich der Gehalt an ATP zu $8{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mol/g Trockengewicht und an ADP zu $3{,}9 \cdot 10^{-6}$ Mol/g Trockengewicht. Alle diese Werte sind höher als die eigenen. Ein Teil dieser Differenz beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der mangelhaften Abtrennung von Phosphatverbindungen, die keine Nucleotide sind. Es kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß die Extrakte der genannten Autoren tatsächlich einen höheren Gehalt an Nucleotiden insbesondere an ATP besaßen, als die auf andere Weise dargestellten eigenen Extrakte. Es wurde mehrfach betont (Weil-Malherbe; Kratzing u. Narayanaswami; Döring u. Gerlach), daß die intensive nervöse Reizung bei der Dekapitation zu außerordentlich rasch verlaufenden chemischen Umsetzungen führen kann, z. B. der Bildung von Ammoniak, dem Zerfall von Kreatinphosphat und von ATP. Der diese Reaktionen auslösende Reiz soll vermieden werden, wenn man die Tiere durch Eintauchen in flüssige Luft tötet, wie es in den zitierten Arbeiten geschehen ist. Bei vergleichenden Untersuchungen mit der Papier- und Ionenaustausch-Chromatographie fanden Coper, Herken u. Koransky gut übereinstimmende Werte bei den Adeninnucleotiden nach Dekapitation der Tiere ohne Narkose. Döring u. Gerlach dagegen erhielten höhere ATP-Werte, wenn sie die Tiere in

Narkose dekapitierten oder durch flüssige Luft töteten. Es fällt allerdings auf, daß ihre Angaben für die Konzentration von GTP und UTP wie für ADP und AMP den eigenen Werten sehr nahe liegen. Würde das Dekapitieren zu einem raschen Zerfall der energiereichen Phosphate geführt haben, so sollten bei GTP und UTP gleichfalls Differenzen auftreten, da kein Anlaß dafür besteht anzunehmen, daß ATP hier eine Sonderstellung unter den energiereichen Nucleotiden einnimmt. Außerdem wäre dann auch bei den energiearmen Monophosphaten, insbesondere beim AMP, ein der ATP-Differenz entsprechender Unterschied zu erwarten, der in den angegebenen Werten nicht zum Ausdruck kommt.

Eine weitere experimentelle Bearbeitung wird klären, ob neben der Tötungsart nicht noch andere Faktoren, wie z. B. das Alter der Tiere für die genannten Unterschiede von ursächlicher Bedeutung sind.

Folgende Abkürzungen werden in der Arbeit verwendet:

AMP	Adenosin-5′-monophosphat	UDP	Uridin-5′-diphosphat
ADP	Adenosin-5′-diphosphat	UTP	Uridin-5′-triphosphat
ATP	Adenosin-5′-triphosphat	UDPAG	Uridin-5′-diphosphat-N-acetylglucosamin
GMP	Guanosin-5′-monophosphat		
GDP	Guanosin-5′-diphosphat	UDPG	Uridin-5′-diphosphat-glucose
GTP	Guanosin-5′-triphosphat		
IMP	Inosin-5′-monophosphat	DPN	Diphosphopyridinnucleotid
UMP	Uridin-5′-monophosphat	TPN	Triphosphopyridinnucleotid

Summary

The acid soluble nucleotides of rat-brains are extracted, separated from each other and analysed quantitatively.

For preparing the extracts the animals are sacrified by using a specially constructed guillotine. The brains frozen in liquid air are ground and extracted with perchloric acid.

The extracted nucleotides are separated by means of a two system ion-exchange chromatography. This method allows a separation as well as a quantitative isolation of the nucleotides in the eluting fluids and their analysis.

The isolated substances are identified by means of chemical analysis, paper-, respectively ion-exchange chromatography and spectrophotometry.

The main amount of the nucleotides consists of adenosinemono-, di- and triphosphate. Beside these there are mono-, di- and triphosphate compounds of guanosine and uridine. Concerning inosine only monophosphate but not di- and triphosphate were detected.

In addition to these substances di- and triphosphopyridinenucleotide, uridine diphosphate acetylglucosamine, uridine diphosphate glucose and very likely uridine diphosphate glucuronic acid were demonstrated. No cytidine compounds could be identified.

The analytical data of the analysed compounds and their concentrations in the brain are tabulated.

The results and their significance for biochemical reactions of the central nervous system are discussed.

Herrn G. Münch bin ich für verständnisvolle und eifrige Hilfe bei der Durchführung der Versuche zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

Albaum, H. G., J. Teppermann and O. Bodánski: J. biol. Chem. **164**, 45 (1946).
Axelrod, J.: Science **126**, 400 (1957).
Baddiley, J. G., B. Buchanan, B. Carss, A. P. Mathias and A. R. Sanderson: Biochem. J. **64**, 599 (1956).
Barnum, C. P., C. W. Nash, E. Jennings, O. Nygaard and H. Vermund: Arch. Biochem. **25**, 376 (1952).
Barrollier, J.: Naturwissenschaften **1955**, 486.
Bennett, E. L., and B. J. Krueckel: Biochim. biophys. Acta **17**, 515 (1955).
Berenblum, J. and E. Chain: Biochem. J. **32**, 295 (1938).
Cabib, E., L. F. Leloir and C. E. Cardini: J. biol. Chem. **203**, 1055 (1953).
Caputto, R., L. F. Leloir, C. E. Cardini and A. C. Paladini: J. biol. Chem. **184**, 333 (1950).
Carter, C. E.: An. Rev. Biochem. **25**, 123 (1956).
Cohn, W. E.: Science **109**, 377 (1949).
Cohn, W. E.: J. Amer. chem. Soc. **72**, 1471 (1950).
Cohn, W. E., and C. E. Carter: J. Amer. chem. Soc. **72**, 4273 (1950).
Colowick, S. P., N. O. Kaplan and M. M. Ciotti: J. biol. Chem. **191**, 447 (1951).
Coper, H.: Unveröffentlichte Versuche.
Coper, H., H. Herken u. W. Koransky: Naturwissenschaften **1954**, 531.
Coper, H., H. Herken u. W. Koransky: Erscheint in Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.
Dawson, R. M. C., and D. Richter: Amer. J. physiol. **160**, 203 (1950).
Deutsch, A., and R. Nilsson: Acta chem. scand. **8**, 1898 (1954).
Dische, Z.: J. biol. Chem. **167**, 189 (1947).
Dixon, J. S., and D. Lipkin: Analyt. Chem. **26**, 1092 (1954).
Döhring, H. J., u. E. Gerlach: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 271 (1957).
Dutton, G. J., and J. D. E. Storey: Biochem. J. **57**, 275 (1954).
Fishman, W. H., and S. Green: J. biol. Chem. **215**, 527 (1955).
Fleckenstein, A., u. J. Janke: Pflüg. Arch. ges. Physiol. **258**, 177 (1953).
Hurlbert, R. B., H. Schmitz, A. F. Brumm, and V. R. Potter: J. biol. Chem. **209**, 23 (1954).
Hurlbert, R. B., and V. R. Potter: J. biol. Chem. **209**, 1 (1954).
Jermyn, M. A. and F. A. Isherwood: Biochem. J. **44**, 402 (1949).
Kennedy, E. P., and S. B. Weiss: J. Amer. chem. Soc. **77**, 250 (1955).
Kennedy, E. P., and S. B. Weiss: J. biol. Chem. **222**, 193 (1956).
Kerr, S. E.: J. biol. chem. **145**, 647 (1942).
Kratzing, C. C., and A. Narayanaswami: Biochem. J. **54**, 317 (1953).
Markham, R., and J. D. Smith: Biochem. J. **45**, 294 (1949).
Marrian, D. H.: Biochim. biophys. Acta **13**, 282 (1954).
Marshak, A., and H. J. Vogel: J. biol. Chem. **189**, 597 (1951).
McIlwain, B. H.: Biochemistry and the Central Nervous System. Boston: Little Brown and Comp. 1955.

Meijbaum, W.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **258**, 117 (1939).
Morgan, W. T. J., and L. S. Elson: Biochem. J. **28**, 988 (1934).
Neubert, D., u. S. Müller: Unveröffentlichte Versuche.
Opitz, E.: Chemie und Stoffwechsel d. Nervengewebes. Mosbacher Symp. Springer 1952.
Partridge, S. M.: Biochem. J. **42**, 238 (1948).
Richter, D., and R. M. C. Dawson: J. biol. Chem. **176**, 1199 (1948).
Schmitz, H., R. B. Hurlbert, and V. R. Potter: J. biol. Chem. **209**, 41 (1954).
Schmitz, H., V. R. Potter, R. B. Hurlbert, and D. M. White: Cancer Res. **14**, 66 (1954).
Smith, J. D., and G. T. Mills: Biochim. biophys. Acta **13**, 386, 387 (1954).
Storey, J. D. E., and G. J. Dutton: Biochem. J. **59**, 279 (1955).
Strominger, J. L., E. S. Maxwell, J. Axelrod, and H. M. Kalckar: J. biol. Chem. **224**, 79 (1957).
Weil-Malherbe, H.: Naturwissenschaften **1953**, 545.
Williams-Ashman, H. G., and J. Banks: J. biol. Chem. **223**, 509 (1956).
Wladimirow, G. Je.: Funktionelle Biochemie des Gehirns, Berlin: Verlag Volk und Gesundheit, 1954, S. 14.
Wyatt, G. R.: in E. Chargaff, and J. N. Davidson: The Nucleic Acids Vol. I, 254. New York: Academic Press Inc. Publ. 1955.

Dr. W. Koransky, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 66—78 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Über pharmakologische Wirkungen an elektrisch gereizten glatten Muskeln

Von

G. Härtfelder, G. Kuschinsky und K. H. Mosler

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Januar 1958)

In den letzten Jahren fand die elektrische Reizung glattmuskeliger Organe zunehmendes Interesse. Sie wurde früher kaum angewandt, obwohl sie technisch sehr einfach durchführbar ist. Nach anfänglicher Verwendung zur Klärung physiologischer Fragestellungen wurde sie neuerdings von einigen Autoren auch zur Untersuchung pharmakologischer Wirkungen benutzt.

Wir haben uns seit längerem mit dieser Methode beschäftigt, nachdem wir gegenüber den konventionellen Methoden einige wesentliche Vorteile erkannt hatten. In der vorliegenden Arbeit soll darüber berichtet werden.

Methodik

1. Weibliche Kaninchen von etwa 3,5 kg Gewicht wurden 1—3 Wochen nach doppelseitiger Ovarektomie mit täglich 0,05 mg Oestradiolbenzoat (Progynon B oleosum[1]) i.m. vorbehandelt (in Anlehnung an das Vorgehen von Csapo u. Corner 1952). In Urethannarkose (1,3 g/kg i.v.) gelegentlich ergänzt durch 1—1,5 ml (= 50—75 mg) des Natriumsalzes der Äthyl-(1-methyl-propyl)-thiobarbitursäure (Inactin[2] i.v.) wurde am 3. bzw. 8. Tag ein Uterushorn operativ entnommen. Jeweils etwa 1 cm lange, längshalbierte Stücke des Uterushorns wurden in einem 80 ml fassenden Badgefäß aufgehängt. Die Aufzeichnung der Kontraktionen erfolgte über einen Torsionsmyographen (isometrisch; Hebelübertragung 1:35, maximale Kontraktionen nicht größer als $^5/_{100}$ der Organlänge) oder über einen einfachen Stirnschreiber (isotonisch; Hebelübertragung 1:5) auf Rußkymographion. Die Belastung betrug bei isotonischer Registrierung 3—5 g, die Vorspannung bei isometrischer Registrierung 1—2 g. Bei Aufbewahrung in Tyrode bei 4° C konnten von demselben Uterushorn auch an den folgenden zwei Tagen noch brauchbare Präparate gewonnen werden.

Die Rattenuteri wurden nichtvorbehandelten Tieren entnommen. Jeweils ein ganzes Uterushorn diente als Testobjekt. Bei isotonischer Registrierung wurden die Organe mit etwa 2 g belastet, bei isometrischer Registrierung wurde eine Vorspannung von 1 g gewählt.

---

[1] Wir danken der Firma Schering A.G., Berlin für die freundliche Überlassung von Oestradiolbenzoat.

[2] Wir danken der Firma Chem. Fabrik Promonta G.m.b.H., Hamburg, für die freundliche Überlassung von Inactin.

Für die Versuche am Darm wurden Meerschweinchen mit 300—400 g Körpergewicht verwendet, denen 36 Std vorher das Futter entzogen worden war. Vom Ileum wurden mehrere 3 cm lange Stücke präpariert und in 10 ml fassende Organbäder gebracht. Die Kontraktionen wurden mittels Stirnschreiber (Hebelübertragung 1:5, Belastung 1,3 g) auf Rußkymographion registriert.

2. Als Elektroden für die elektrische Reizung dienten 2 Ringe aus Platin- oder Silberdraht mit einem Radius von etwa 0,5 cm, von denen der eine waagrecht am Boden des Badgefäßes und der zweite im Abstand von 3 bis 4 cm parallel verschiebbar darüber angebracht war. Im 10 ml-Organgefäß (Versuche mit dem Meerschweinchendarm) wurden die Ringe einfach in der gewünschten Höhe eingeklemmt

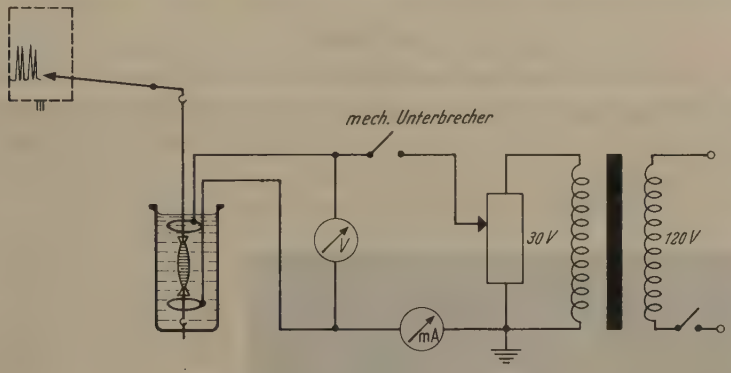


Abb. 1. Schaltplan der Wechselstromreizung

und blieben durch ihre eigene Elastizität fixiert, im 80 ml-Badgefäß (Versuche mit den Uteri) wurden sie an einem L-förmigen Träger aus Plexiglas festgehalten. Zwischen den Ringen waren die Organstücke frei aufgehängt.

Zur Reizung wurde Wechselstrom aus dem Netz (120 V) verwendet. Über potentiometrisch geschaltete Widerstände konnte die Spannung geregelt werden. Die Spannungen an den Elektroden bzw. die Stromstärken wurden mit Multavi II bei geschlossenem und offenem Stromkreis während des Versuchs gemessen. Mit Hilfe eines Kathodenstrahloscillographen ließ sich zeigen, daß die Sinusform des Netzwechselstromes auch an den Elektroden während einer elektrischen Reizung vorhanden war. Die Einfachheit der Schaltung, bei der kein „Reizgerät" benötigt wurde, ist aus der Zeichnung zu ersehen (Abb. 1).

Die Reizung wurde in späteren Versuchen durch einen Kontaktgeber automatisiert, der nach Art eines Zeitgebers von unserer Werkstatt gebaut war. Reizdauer und Unterbrechungszeit ließen sich durch Verstellen der Kontaktfedern und durch Änderung der Umdrehungsgeschwindigkeit regeln.

Die Reizstärken betrugen 0,5—20 V Wechselstrom (= 0,125—5 V/cm), die Reizzeit 2½—5 sec, die Unterbrechung 30—120 sec. Organe mit Spontanrhythmik wurden jeweils etwas frequenter gereizt als es der Eigenfrequenz entsprach. In den meisten Versuchen wurden die Reize in konstanten Abständen gesetzt. Nur in einer Anzahl von Versuchen am Meerschweinchenileum wurde zur sicheren Vermeidung einer Tonussteigerung nach je 4 Reizen die Badflüssigkeit gewechselt und eine Reizpause von 4 min eingelegt.

3. Als Badflüssigkeit diente gewöhnliche Tyrode nach Muralt (1949), die ausgiebig mit einem O_2-CO_2-Gemisch (95:5) bzw. in einigen Versuchen am Ileum mit Sauerstoff durchperlt wurde. Die Badtemperatur wurde konstant bei 37° C

gehalten. Folgende Substanzen[1] wurden geprüft: Acetylcholin (ACh) (Roche), Adrenalin (Suprareninum, Hoechst), Noradrenalin (Arterenol, Hoechst), Atropinum sulf., $BaCl_2$, $CaCl_2$, Chininum bisulf., Coffeinum purum (Ingelheim), Theophyllin-Diaethanolamin (Deriphyllin, Homburg), Dihydroergotamin (DHE) (Sandoz), Ergotamintartrat (Gynergen, Sandoz), Hexamethonium, Histamin (Imido, Roche), Hypophysin (Hoechst), KCl. Methylergobazintartrat (Methergin, Sandoz), $MgCl_2$, Morphin. hydrochl., Oxytosin (Orasthin, Hoechst), Papaverinum hydrochl. (Ingelheim), Prostigmin = „Neostigmin" (Roche), Phentolamin (Regitin = 2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin, Ciba), Tetraäthalammoniumbromid (TEAB), Theophyllinum purum (Ingelheim).

Ergebnisse

I. Methodische Untersuchungen ohne Verwendung von Pharmaka

Unter dem Einfluß des für wenige Sekunden fließenden elektrischen Stromes kam eine annähernd synchron verlaufende Kontraktion des Kaninchenuterus und des Ileums zustande. Die Größe des Effektes war von der angelegten elektrischen Spannung abhängig (Abb. 2). Dabei bestand kein Unterschied im Verhalten unter isometrischen und isotonischen Bedingungen. Für jedes Präparat gab es ein optimales Potentialgefälle. Dieses betrug für den Kaninchenuterus etwa 3 V/cm, für den Rattenuterus 2 V/cm. Am Meerschweinchendarm lag die optimale Spanung bei etwa 1 V/cm. Die Reizschwelle war am Kaninchen- und Rattenuterus bei 0,75 V/cm und am Meerschweinchendarm bei 0,5 V/cm zu finden. Durch eine Verlängerung der Reizdauer ließ sich der Kontraktionseffekt ebenfalls innerhalb gewisser Grenzen verstärken. Einen maximalen Effekt ergab am Kaninchenuterus eine Reizdauer von 2,5—5 sec, am Rattenuterus 0,5—2 sec und am Meerschweinchenileum von > 4 sec.

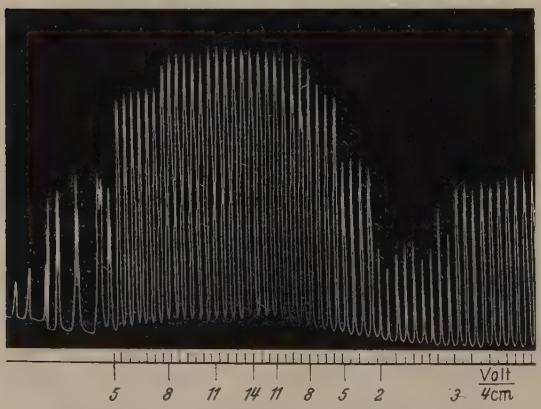


Abb. 2. Wirkung verschiedener Reizstärken. Isolierter Kaninchenuterus, submaximale elektrische Reizung, isotonische Registrierung. Unter der Darstellung der Kontraktionen ist die elektrische Reizung markiert (| | | | |). Der zeitliche Abstand zwischen zwei Reizmarkierungen ist gleich 1 min

Befand sich der glatte Muskel durch Einwirkung eines Pharmakons in einem Kontrakturzustand, so war die darauf aufgepfropfte Wirkung

[1] Wir danken den genannten Firmen für die freundlichst zur Verfügung gestellten Substanzen.

des elektrischen Stromes biphasisch: anschließend an eine Kontraktion war eine Erschlaffung über den Ausgangszustand hinaus zu beobachten.

Die elektrische Reizantwort war quantitativ reproduzierbar: bei Wiederholung der Reizung in konstanten zeitlichen Abständen ergaben sich nach den ersten 15—30 min, in denen die Kontraktionen stetig größer wurden, über Stunden hinweg gleichmäßige Kontraktionshöhen. Nur ganz allmählich wurden die Kontraktionen wieder geringer.

Eine „positive Treppe" sah man auch nach jedem Wechsel der Badflüssigkeit. Diese Treppe ging einer Neueinstellung des p_H-Wertes einer frisch zugegebenen Tyrodelösung von 8,3 auf 7,5 parallel, womit nicht gesagt sein soll, daß p_H-Änderungen der Badflüssigkeit als einzige Ursache anzunehmen wären. Dies ergibt sich schon daraus, daß das Phänomen einer Treppe auch nach jeder längeren Reizpause oder nach einem Übergang von einer Reizfrequenz oder einer Stromstärke auf eine andere zu beobachten war.

Neben der Abnahme der Kontraktionshöhe im Laufe eines mehrstündigen Versuches fand sich eine Zunahme der Empfindlichkeit, gemessen an der Reizschwelle für elektrische Spannungen. Diese Erniedrigung der Reizschwelle war um so ausgeprägter, je höher die vorher angelegte elektrische Spannung war.

Insoweit reagierten die untersuchten drei Organe (Kaninchenuterus, Rattenuterus, Meerschweinchenileum) gleichartig. Die häufig vorhandene Spontanrhythmik des Kaninchen- oder Rattenuterus konnte durch die künstliche Reizung meist unterdrückt werden. Dagegen wurde bei einer Anzahl von Darmpräparaten eine Tonussteigerung nach mehrmaliger elektrischer Reizung beobachtet. Diese Tonuszunahme war zu vermeiden, wenn in gleichmäßigen Abständen die Badflüssigkeit gewechselt und Reizpausen eingelegt wurden.

II. Versuche mit Pharmaka

1. Versuchsplan. Zur Untersuchung von Pharmaka wurde die Frequenz des Reizstromes nicht variiert. Sie war durch die Verwendung des Netzwechselstromes (50 Hz) festgelegt. Die Reizzeit wurde in den Versuchen an den Uteri maximal gehalten, um die Spontanbewegungen sicher zu unterdrücken. Mit der am Darm angewandten Reizzeit von 4 sec wurden ceteris paribus etwa 80% der maximalen Kontraktionshöhen erreicht. Im Gegensatz dazu änderten wir die *Reizstärke* systematisch, da sich in Vorversuchen hierbei eine stärkere Beeinflußbarkeit der pharmakologischen Effekte ergeben hatte.

Im folgenden sollen zunächst die Substanzwirkungen bei submaximaler Reizung beschrieben werden. Infolge des S-förmigen Verlaufs der Spannungs-Wirkungs-Kurve waren hierbei die inhibitorischen Effekte besonders ausgeprägt. Die stärksten excitatorischen Wirkungen waren bei Schwellenreizung zu erwarten. Da jedoch am Kaninchen- und Rattenuterus die Spontanrhythmik häufig erst durch höhere Reizstärken unterdrückt werden konnte, wurden auch die Wirkungen stimulierender Substanzen zum größten Teil unter submaximalen Reizbedingungen untersucht.

2. Die Wirkung von Pharmaka am Uterus. Die Einzelangaben beziehen sich, wenn nicht anders erwähnt, auf den Kaninchenuterus.

a) Die Wirkung inhibitorischer Substanzen bei submaximaler Reizung. Eine Anzahl von Pharmaka, deren spasmolytische oder lähmende Wirkung bekannt ist, wurden bei mittlerer Reizstärke von 1 bis 2V/cm geprüft. Sämtliche Substanzen bewirkten eine etwa logarithmisch gegen die Zeit zunehmende Depression der elektrisch ausgelösten Kontraktionen. Die Stärke der Wirkung war abhängig von der Substanzkonzentration (Abb. 3; vgl. auch Abb. 6b). Für Papaverin lag die Schwelle bei einer Konzentration von etwa 10^{-7} g/ml am Kaninchenuterus, 10^{-6} g/ml am Rattenuterus, für Chinin bei 10^{-5} g/ml am Kaninchenuterus, 10^{-4} g/ml am Rattenuterus, für Theophyllin, Deriphyllin und Coffein bei 10^{-4} g/ml und für $MgCl_2$ bei 10^{-3} g/ml.

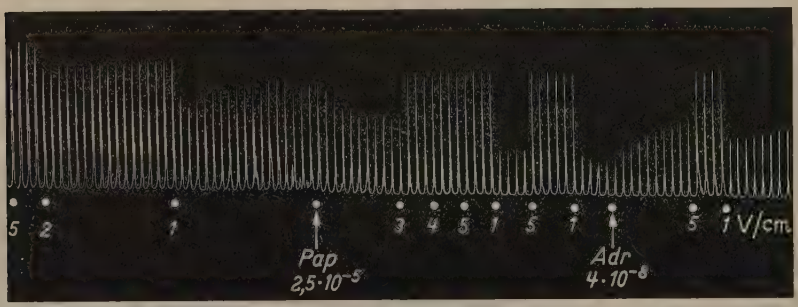


Abb. 3. Isolierter Kaninchenuterus, submaximale elektrische Reizung, isotonische Registrierung. Die Wirkung von Papaverin (*Pap*) bei verschiedenen Reizstärken (*V/cm*), und die antagonistische Beeinflussung durch Adrenalin (*Adr*)

Charakteristisch für die Wirkung der genannten Substanzen war, daß vorhandene Reste von Spontanbewegungen zugleich mit der Verminderung der Reizantworten völlig verschwanden.

b) Die Wirkung stimulierender Substanzen bei submaximaler Reizung. Die Wirkung stimulierender Stoffe auf den submaximal gereizten Uterus bestand in einer Veränderung der Größe der elektrisch ausgelösten Kontraktionen mit oder ohne Steigerung des Grundtonus. Im Extremfalle ergab sich entweder eine Zunahme der Kontraktionshöhen bei gleichbleibendem Grundtonus (Reaktionsform I, vgl. Abb. 6a oder 3) oder eine Kontraktur mit aufgesetzten elektrischen Reizantworten, die kleiner waren als in der Ausgangslage (Reaktionsform II, vgl. Abb. 4). Hierbei traten nicht selten rhythmische Kontraktionen auf, die mit den elektrisch ausgelösten interferierten. Je stärker die Kontraktur ausgeprägt war, desto kleiner waren die aufgesetzten Kontraktionen. Als Regel konnte gelten, daß die Ausbildung der II. Reaktionsform um so deutlicher war, je höher die Konzentration der einwirkenden Substanz gewählt wurde. Im Bereich der Schwellendosis fand sich meist eine vorübergehende leichtere Kontraktur mit vergrößerten elektrisch ausgelösten Kontraktionen, die auch nach dem Abklingen der Kontraktur

unvermindert auftraten. Bei Substanzen, die periodisch Kontrakturen verursachten, ergab sich nicht selten eine Verbindung der Reaktionstypen I und II in zeitlicher Aufeinanderfolge, synchron mit den Kontrakturphasen.

Die Untersuchung bekannter oxytoxisch wirkender Substanzen wie Methergin, Ergotamin, Hypophysin, Histamin sowie $BaCl_2$ und $CaCl_2$ erbrachte im einzelnen bei submaximaler Reizung folgende Ergebnisse:

Methergin bewirkte in einer Konzentration von etwa $3 \cdot 10^{-7}$ g/ml eine langanhaltende Verstärkung der Kontraktionen um 30—50% ohne Veränderung des Ruhetonus. Der Effekt war ausspülbar und ließ sich annähernd quantitativ wiederholen. Ohne elektrische Reizung zeigte sich erst bei der dreifach höheren Dosis eine Stimulierung in Form von periodisch wiederkehrenden Kontrakturen mit überlagerten rhythmischen Kontraktionen. Am Rattenuterus konnte außerdem eine Erniedrigung der Reizschwelle für den elektrischen Strom gezeigt werden.

Abb. 4
Isolierter Kaninchenuterus, elektrische Reizung. Die Wirkung eines stimulierenden Pharmakons bei supramaximaler elektrischer Wechselstromreizung

Die Wirkung von Ergotamin war der von Methergin ähnlich.

Mit Hypophysenhinterlappenextrakten gelang es bei einer Dosierung von 0,5—1 mE/ml ebenfalls die elektrisch ausgelösten Kontraktionen zu verstärken, ohne daß gleichzeitig das Kurvenbild durch stärkere Kontrakturen oder automatische Bewegungen gestört wurde. Wie Versuche ohne elektrische Reizung zeigten, wurde bei diesen Konzentrationen die Spontanrhythmik zu ungeordneten Bewegungen bereits angeregt, sie wurde aber durch die elektrischen Impulse in regelmäßige Reizantworten aufgelöst. Am Rattenuterus wurden unterschwellige elektrische Reize nach 1 mE/ml wirksam.

Eine Verstärkung der Kontraktionen ohne gleichzeitige Kontraktur und ohne Anregung der Spontanrhythmik ließ sich auch mit $BaCl_2$ in der Konzentration von 10^{-5} bis 10^{-6} g/ml zeigen. Bei höheren Konzentrationen kam es zu Kontrakturen und nicht unterdrückbaren rhythmischen Bewegungen. Ähnlich waren die Ergebnisse, die durch Histamin oder durch Erhöhung des Gehalts der Tyrodebadflüssigkeit an Kalium- und Calciumionen erzielt wurden.

c) Die Wirkung „neurotroper" Pharmaka bei submaximaler Reizung. Die Pharmaka des vegetativen Nervensystems, Acetylcholin und Adrenalin, wirkten wie die oben beschriebenen stimulierenden Substanzen. Die Schwellenkonzentration, bei der eine Verstärkung der Kon-

Kontraktionen ohne Kontraktur zustande kam, lag für Acetylcholin bei 10^{-7} g/ml und für Adrenalin bei 10^{-8} g/ml.

Bei etwa den gleichen Konzentrationen ergab sich auch in den Versuchen *ohne* elektrische Reizung eine nennenswerte Erhöhung der

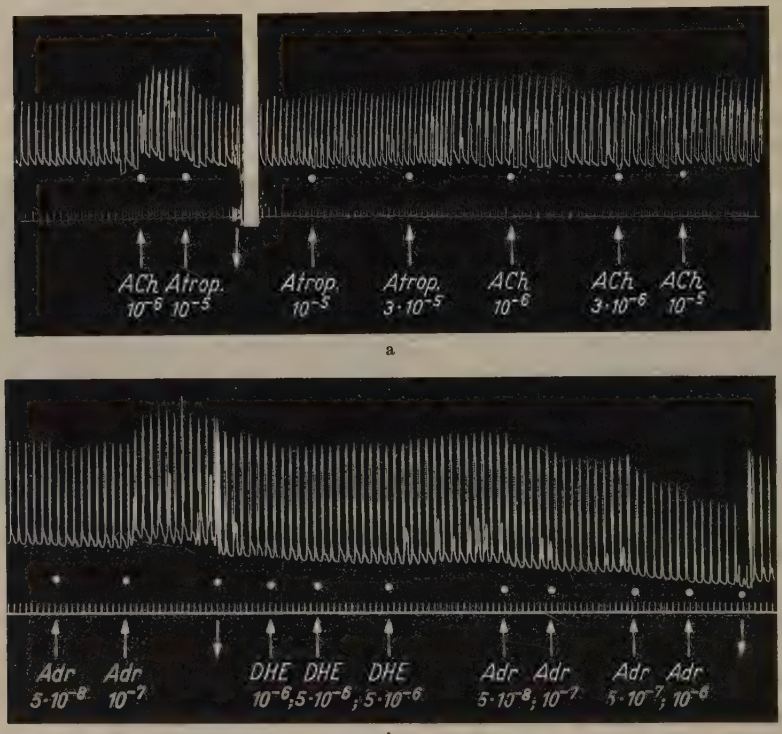


Abb. 5a u. b. Isolierter Kaninchenuterus, submaximale elektrische Reizung. Versuche mit spezifischen Antagonisten. *ACh* Acetylcholin; *Atrop*; Atropin; *Adr.* Adrenalin. *DHE* Dihydroergotamin

Frequenz der Spontanbewegungen und des Tonus. Die Kontrakturen nach hohen Dosen Adrenalin zeigten gelegentlich einen periodischen Verlauf mit Phasen völliger Erschlaffung. Es ließ sich mit Hilfe der elektrischen Reizung demonstrieren, daß auch in diesem Zustand der Erschlaffung eine erhöhte Erregbarkeit bzw. Kontraktionsfähigkeit vorhanden war. (Dieser Nachweis ließ sich auch bei anderen Substanzen führen, wenn deren Wirkung bei höherer Dosierung in einem Wechsel von Kontraktur und Erschlaffungsphasen bestand, besonders bei Methergin und Hypophysenhinterlappenhormon.)

Als Versuch, den Wirkungsmechanismus der elektrischen Reizantwort zu klären, sind die Experimente mit Atropin, TEAB und Cocain zu bewerten. Atropin hatte bis zu einer Konzentration von 10^{-5} g/ml keinerlei

Hemmwirkungen, sondern führte gelegentlich zu einer Steigerung der Kontraktionen. TEAB führte in Konzentrationen über 10^{-4} g/ml zu einer Kontraktionsverstärkung oder zu stärkerer Anregung der Spontanrhythmik und zu Kontrakturen. Cocain hatte bis 10^{-5} g/ml entweder keine Wirkung oder verursachte eine Kontraktur mit entsprechender Verringerung der aufgesetzten elektrisch ausgelösten Kontraktionen.

d) Der Einfluß der Stärke der elektrischen Reizung auf die Substanzwirkungen. Die Stärke der Wirkung spamsolytischer Stoffe war außer von der Substanzkonzentration von der Stärke der elektrischen Reizung abhängig: bei größerem Stromdurchgang, also bei größeren Kontraktionen war die inhibitorische Wirkung prozentual geringer.

Die Beeinflussung der Wirkung eines stimulierenden Stoffes wurde für Adrenalin untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Schwellendosis für die Vergrößerung der elektrisch ausgelösten Kontraktionen ebenso wie für die bei hohen Konzentrationen auftretende Kontraktur bei stärkeren elektrischen Impulsen erhöht. In Abb. 4 ist außerdem zu sehen, daß bei supramaximaler Reizung die oben als Reaktionsform I bezeichnete reine Kontraktionszunahme nicht mehr auftrat, sondern die Reaktion des Organs nur noch in einer Kontraktur mit aufgesetzten schwächeren elektrischen Reizantworten bestand (Reaktionsform II). Außerdem wurde durch kräftigere elektrische Impulse die unter der Substanzwirkung entstehende lebhafte Spontanrhythmik stärker unterdrückt.

e) Kombinationsversuche. Ob die dargestellten Effekte den sonst bekannten Wirkungen der betreffenden Substanzen entsprechen, war am besten in Kombinationsversuchen mit spezifischen Antagonisten zu klären. Wir konnten zeigen, daß sich auch am elektrisch gereizten Uterus Atropin als Antagonist zu Acetylcholin und Regitin sowie DHE zu Adrenalin verhielt (Abb. 5a u. 5b), obwohl diese Substanzen in der angewandten Konzentration keine Eigenwirkung hatten. Ein Beispiel für einen unspezifischen Antagonismus findet sich in Abb. 3.

3. Die Wirkung von Pharmaka am Meerschweinchenileum. Das Kurvenbild des elektrisch gereizten Darms war besonders gleichmäßig, da keine Spontanrhythmik wie am Uterus vorhanden war. Die Verkürzung des Ileumstückes unter einer Reizspannung von 1 V/cm entsprach der unter der Einwirkung einer Acetylcholinkonzentration von etwa 10^{-8} g/ml. Auch über Elektroden, die im Darmlumen angebracht waren, ließen sich Kontraktionen auslösen; diese waren jedoch kleiner als die nach Reizung über Außenelektroden.

Im Gegensatz zu den Befunden am Uterus wurde bei submaximaler Reizung nach stimulierenden Pharmaka meist keine Zunahme der Kontraktionen gesehen (z. B. nach Acetylcholin oder Histamin). Statt dessen trat häufig eine anhaltende Kontraktur ein, auf die während der elektrischen Reizung kleinere Kontraktionen aufgesetzt waren (Reaktionstyp II). Nur mit $BaCl_2$ (10^{-5}—10^{-4} g/ml) war ziemlich regelmäßig

eine alleinige Kontraktionsverstärkung ohne Tonuserhöhung zu demonstrieren (Reaktionstyp I, Abb. 6a). Wurde dagegen mit *Schwellenstromstärken* elektrisch gereizt, so war auch mit anderen stimulierenden Substanzen, z. B. mit Prostigmin ($5 \cdot 10^{-9}$ g/ml) eine reine Kontraktionszunahme zu erzielen. (Erst bei 10^{-8} g/ml zeigte Prostigmin eine Eigenwirkung in Form einer Kontraktur.)

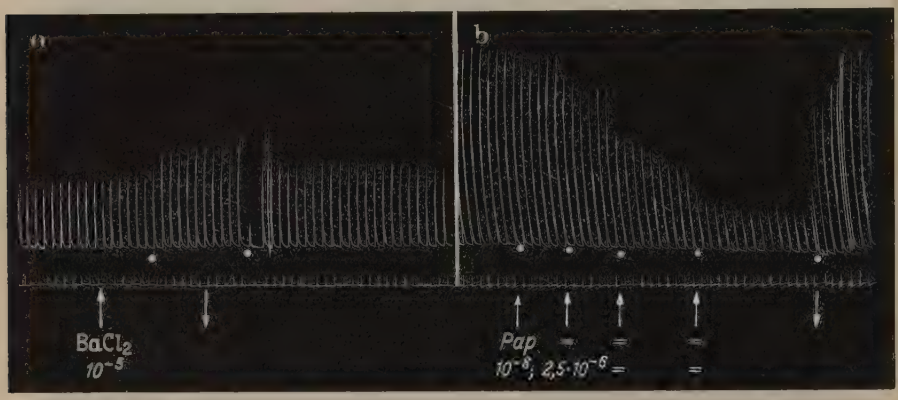


Abb. 6 a u. b. Isoliertes Meerschweinchenileum, isotonische Registrierung. a Bariumchlorid und b Papaverin (*Pap*) bei submaximaler elektrischer Reizung

Wenn ein Kontraktureffekt von Acetylcholin oder Histamin durch einmaliges Ausspülen aufgehoben wurde, fanden sich gelegentlich im Anschluß daran verstärkte Reizantworten, so daß auch für diese Substanzen die Möglichkeit einer Stimulierung nach Reaktionstyp I nicht ausgeschlossen ist.

Ebenso wie am Uterus ließ sich bei submaximaler Reizung besonders gleichmäßig der Effekt depressiv wirkender Pharmaka zeigen. Papaverin hemmte bei 10^{-6} bis $5 \cdot 10^{-6}$ g/ml mittelstarke Kontraktionen um etwa 50% (Abb. 6b), ähnlich Chinin bei 10^{-4} g/ml und Morphin bei 10^{-7} g/ml. Auf die Adrenalin- und die ähnliche Noradrenalinwirkung ist in der nachstehenden Arbeit ausführlich eingegangen worden. Ebenso wie Paton und im Gegensatz zu den eigenen Befunden am Uterus konnten wir mit Atropin in niedriger Konzentration die elektrisch ausgelösten Kontraktionen fast völlig unterdrücken. Mit Hexamethonium in einer Konzentration von 10^{-6} g/ml bis 10^{-4} g/ml sahen wir ebenfalls eine Hemmwirkung. Diese trat nicht selten erst nach einer schnell ablaufenden Kontraktur auf.

Hexamethonium ist das einzige der von uns untersuchten Pharmaka, bei dem anschließend an eine mäßig starke Kontraktur eine depressive Wirkung auf die elektrisch ausgelösten Kontraktionen beobachtet werden konnte.

Besprechung

Die von uns angewandte elektrische Reizung mit sinusförmigem Wechselstrom entspricht am ehesten der von Csapo u. Mitarb. ausgearbeiteten Methode (Csapo u. Corner 1951a; Csapo u. Goodall 1954). Die anderen Autoren bevorzugten

Gleichstromöffnungs- und Schließungszuckungen, faradische Ströme aus einem Induktorium oder Rechteckimpulse aus einem Reizgenerator. Im Prinzip lassen sich mit allen diesen Variationen der elektrischen Reizung gleichartige Ergebnisse erzielen, wobei auch die bei den einzelnen Untersuchern verschiedene Anordnung der Elektroden ohne wesentliche Bedeutung ist. (Csapo u. Goodall haben allerdings angegeben, daß bei Gleichstromreizung oder bei Reizung mit Rechteckimpulsen der Uterus vom Kaninchen nur submaximal, verglichen mit Wechselstromreizung, reagiert, bei einer Dauer von über 1 sec außerdem tetanische Kontrakturen auftreten und das Verhalten gegen spätere Reize sich ändert.) Die Angaben der einzelnen Autoren über die verwendeten Reizstärken variieren beträchtlich, da die am Organ wirksame Spannung abgesehen von der Impulsform im besonderen Maße vom Elektrodenabstand abhängig ist und die Umrechnung auf eine Streckeneinheit meist nicht erfolgte. Je nach Versuchsanordnung und Fragestellung wurden Spannungen von 0,5 V (Schwellenreiz am Uterus verschiedener Tierarten, Bozler 1938) bis 80 V (starker Reiz am Meerschweinchendarm, Munro 1953) als geeignet gefunden. Die Dauer der Reize betrug bis zu 10 sec (Munro; Csapo u. Goodall) und 20 sec (Greeff u. Holtz 1956). Die von uns meist angewandten Spannungen von 3—9 V = 1—3 V/cm und die Reizdauer von $2^1/_2$—5 sec entsprechen den von Csapo u. Corner (1951a; 1952) als submaximal bzw. optimal wirksam beschriebenen Reizen.

Daß wir im Gegensatz zu Csapo (1954) mit isometrischer, ebenso wie mit isotonischer Registrierung abgestufte Reizantworten am Kaninchenuterus erhalten haben (vgl. Abb. 2 u. 3), erscheint erwähnenswert, da Csapo aus seiner Beobachtung einer Alles- oder Nichts-Reaktion bei *isotonischer* Registrierung die Hypothese abgeleitet hat, am Uterus gäbe es längsgerichtete muskuläre Funktionseinheiten, die über die ganze Länge des Uterus reichten.

Den Wirkungsmechanismus der Kontraktionsauslösung durch elektrische Reize hat Paton am Meerschweinchendarm eingehend analysiert. Wir können seine Befunde ebenso wie die von Greeff u. Holtz (1956) und die von Munro (1953) bezüglich einer starken Atropinhemmwirkung bestätigen, finden aber auch eine depressive Wirkung von Hexamethonium, so daß außer einer stimulierenden Wirkung auf den cholinergischen Endapparat auch eine Mitwirkung über die Ganglien möglich erscheint. Der Wirkungsmechanismus am isolierten Uterus vom Kaninchen ist offenbar davon grundsätzlich verschieden, da Atropin selbst in hoher Dosierung keine oder sogar eine stimulierende Wirkung hat. (Es muß allerdings dabei bedacht werden, daß wir die Atropinwirkung nur an Organstücken untersuchten, die am Vortage entnommen worden waren.)

Der Unterschied zwischen Uterus und Ileum wird auch in den Befunden über die Wirkung von Cocain deutlich. Während die Untersucher am Ileum (Munro 1953; Paton 1955a u. 1955b) eine starke Verminderung bis völlige Auslöschung der elektrischen Reizantworten sahen, konnten Bozler (1938) und wir am Uterus keine Hemmwirkung beobachten. Daß Ganglienblocker wie TEAB keine inhibitorischen Wirkungen am Uterus besitzen, ist verständlich, da angenommen werden darf, daß die Uterusmuskulatur keine Ganglienzellen enthält. Nachdem auch Sympatholytica keine Wirkung gegen die elektrischen Reizantworten haben und

somit bisher keine spezifisch blockierende Substanz als inhibitorisch wirksam am Uterus gefunden worden ist, muß zunächst eine direkte Wirkung des elektrischen Stromes auf die Muskelfasern des Kaninchenuterus als wahrscheinlich gelten.

Diese Deutung des Mechanismus der Wirkung des elektrischen Stromes am Uterus ist zwar als Grundlage für die pharmakologische Prüfung von Substanzen nicht völlig befriedigend, da es sich um eine indirekte Beweisführung handelt. Davon abgesehen könnte gerade in der augenfälligen Verschiedenheit des Reaktionsablaufs der Reizantwort an Darm und Uterus die Möglichkeit zu einer Differenzierung von Pharmaka bei der Prüfung an Darm und Uterus eingeschlossen sein.

Unter rein pharmakologischen Gesichtspunkten wurde die Methode der elektrischen Reizung bisher nur selten verwendet. Bishop u. Kendall (1928) fanden eine Verstärkung der Kontraktionen durch Histamin am Meerschweinchendarm. Mit unseren Befunden stimmt überein, daß sie den Grad der Verstärkung von dem Ausmaß der Histaminkontraktur abhängig fanden. Ihre Abbildungen sind jedoch wenig überzeugend. Mit gutem Erfolg benutzte Watts (1956) die Hemmung der elektrisch ausgelösten Kontraktionen durch Adrenalin am Rattenuterus zur quantitativen Prüfung des Adrenalingehaltes von Gewebsextrakten. Schaumann (1955) sowie Paton (1957) untersuchten die depressive Morphinwirkung am elektrisch gereizten Ileum und Naess u. Schanche (1957) konnten eine inhibitorische Wirkung von Barbituraten zeigen.

Gegenüber den herkömmlichen Methoden von Substanzprüfungen an der glatten Muskulatur sehen wir bei der elektrischen Reizung folgende Vorteile: Die Empfindlichkeit des Organs gegen einen definierten Reiz ist mit geringstem Zeitverlust beliebig oft vorzutesten, bevor die Wirkung einer bestimmten Substanz untersucht wird. Während der Einwirkung eines stimulierenden Pharmakons kann jederzeit die Kontraktionsbereitschaft geprüft werden; häufig lassen sich hierbei Veränderungen in einem Zeitpunkt finden, zu dem die Wirkung des Stoffes spontan noch nicht oder nicht mehr sichtbar ist. Bei einigen Substanzen ist eine gesteigerte Kontraktionsfähigkeit bei Konzentrationen nachzuweisen, bei denen die Substanz im Sinne der herkömmlichen Methoden noch keine Eigenwirkung zeigt. Daß infolge der Stetigkeit der Veränderungen das Kriterium der Wirkung (Maximum der Zunahme oder Abnahme) eindeutig ist, muß für quantitative Untersuchungen als weiterer Vorteil anzusehen sein.

(Bisher ließ sich z. B. für quantitative Prüfungen von Hypophysenhinterlappenhormon am Uterus keine einheitliche Auffassung darüber erreichen, ob das beste Kriterium die Kontraktionshöhe nach einer bestimmten Zeit, die Gesamtfläche der häufig unregelmäßigen Kontraktionen, die stärkste einzelne Kontraktion oder die Zunahme der Eigenfrequenz darstellt.)

Besonders geeignet erscheint die Methode der elektrischen Reizung zur Prüfung spasmolytischer oder lähmender Stoffe. Dabei mag es günstig sein, daß der Schreibhebel infolge der sich ständig wiederholenden Bewegungen niemals „hängen" bleiben kann und die „Erschlaffung" sich an

eine völlig konstante Ausgangslage anschließt. (Das bei den herkömmlichen Methoden häufig unsichere Extrapolieren eines mehr oder weniger schnell abklingenden Acetylcholin- oder Bariumeffektes, dem noch dazu Kontraktionsrhythmen aufgesetzt sind, ist damit als Fehlerquelle ausgeschaltet.) Gegenüber Versuchen am spontan kontrahierenden Kaninchendarm dürfte es von Vorteil sein, daß Frequenz und Kontraktionshöhen durch einen meßbaren Reiz erzeugt und variiert werden können.

Die elektrische Reizung läßt sich auch für die Prüfung von Antagonisten verwenden. Der Vorteil ist augenfällig bei Untersuchungen des spezifischen Antagonismus inhibitorisch wirkender Substanzen, da keine Vorbehandlung mit einer kontrakturerzeugenden dritten Substanz notwendig ist. (Über die quantitative Auswertung eines solchen Antagonismus wird in der anschließenden Arbeit berichtet (Härtfelder, Kuschinsky u. Mosler 1958).

Summary

Experiments have been performed on the isolated uterus of the rabbit and of the rat and on the isolated ileum of the guinea-pig. Electrical stimulation (alternating current) caused contractions, the amplitude of which depended on the strength of stimulation; the responses were constant for hours. Spontaneous activity was suppressed by intermittent electrical stimulation.

Both atropine and hexamethonium depressed the response of the ileum to electrical stimulation; atropine was more potent than hexamethonium. These substances as well as cocaine failed to depress the response of the uterus. The increase in response to electrical stimulation by acetylcholine was antagonized by atropine.

The response of the uterus was enhanced by stimulating substances (methergin, gynergen, pituitary posterior hormon, acetylcholine, adrenaline, histamine and $BaCl_2$), which in high concentrations caused longlasting contractures.

Some substances induced a periodic repetition of contractures. During the relaxation phases increased responses to electrical stimulation were observed.

Spasmolytic substances depressed the response to electrical stimulation; the action was related to the dose. The small doses of the drugs showed more pronounced effects when the electrical stimulation was submaximal.

The action of various substances on the electrically stimulated ileum of the guinea-pig was found to correspond to their action on the resting ileum. The method of electrical stimulation seems to be very convenient for the study of inhibitory substances. The advantages of the method are discussed.

Literatur

Bishop, G. H., and A. I. Kendall: The effects of histamine, formaldehyd and anaphylaxis upon the responses to electrical stimulation of guinea-pig intestinal muscle. Amer. J. Physiol. **85**, 546 (1928).

Bozler, E.: Electric stimulation and conduction of excitation in smooth muscle. Amer. J. Physiol. **122**, 614 (1938).

Csapo, A.: Dependence of isometric tension and isotonic shortening of uterine muscle on temperature and on strength of stimulation. Amer. J. Physiol. **177**, 348 (1954).

Csapo, A., and G. W. Corner: Shortening of uterine muscle at different temperatures. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **78**, 266 (1951a).

Csapo, A., and G. W. Corner: In vitro contracture of pseudopregnant uterine muscle contrasted with estrous motility. Endocrinologie **49**, 349 (1951b).

Csapo, A., and G. W. Corner: The antagonistic effects of estrogen and progesteron on the staircase phenomenon on uterine muscle. Endocrinologie **51**, 378 (1952).

Csapo, A., and M. Goodall: Excitability length tension relation and kinetics of uterine muscle contraction in relation to hormonal status. J. Physiol. (Lond.) **126**, 384 (1954).

Greeff, K., u. P. Holtz: Untersuchungen am isolierten Vagus-Magenpräparat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 427 (1956a).

Greeff, K., u. P. Holtz: Über die Natur des Überträgerstoffes vagal-motorischer Magenerregungen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 559 (1956b).

Härtfelder, G., G. Kuschinsky u. K. H. Mosler: Der Antagonismus verschiedener Sympatholytika gegenüber dem inhibitorischen Adrenalin- oder Noradrenalineffekt am elektrisch gereizten Meerschweinchenileum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 91 (1958).

Munro, A. F.: Effect of autonomic drugs on the responses of isolated preparations from the guinea-pig intestine to electrical stimulation. J. Physiol. (Lond.) **120**, 41 (1953).

Muralt, A.: Einführung in die praktische Physiologie. 3. Auflage. Heidelberg: Springer 1949.

Naess, K., and S. Schanche: The action of barbiturates on the intestine. Acta pharmacol. (Kbh.) **13**, 90 (1957).

Paton, W. D. M.: The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. J. Physiol. (Lond.) **127**, 40 (1955a).

Paton, W. D. M.: A method of stimulating the guinea-pig ileum using coaxial electrodes. J. Physiol. (Lond.) **129**, 7 (1955b).

Paton, W. D. M.: The responses of, and release of acetylcholine by guinea-pig small intestine in response to coaxial electrical stimulation. XX. Internat. Physiol. Congres (Bruxelles), Abstracts 1956, 708 (1956).

Paton, W. D. M.: The action of morphin and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. **12**, 119 (1957).

Schaumann, W.: Verminderung des Wirksamkeitsunterschiedes optischer Isomerer mit steigender Konzentration. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 41 (1956a).

Schaumann, W.: Pharmakologische Beeinflussung der Erregungsleitung am Darm. Naunyn-Schmiederg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 432 (1956b).

Watts, D. T.: Arterial blood epinephrine levels during Hemorrhagic hypotension in dogs. Amer. J. Physiol. **184**, 271 (1956).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakol. Inst. der Univ. Mainz

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak., Bd. 234, S. 79—90 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. med. L. Lendle)

Pharmakologische Untersuchungen am artefiziellen Dauer-Nystagmus des Meerschweinchens

Von
H. dal Ri und K.-P. Schaefer

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. März 1958)

Nausea, Schwindel und Erbrechen begleiten nicht selten den therapeutischen Effekt zentralnervös wirksamer Substanzen. Neben spezifischen Wirkungen auf das sog. Brechzentrum in der Formatio reticularis des Hirnstammes kann der Vestibularapparat an der Auslösung solcher Symptome beteiligt sein (Borrison u. Wang). Auch im Falle des Morphinerbrechens wird eine vestibuläre Komponente vermutet (Rubin u. Winston). In der vorliegenden Mitteilung soll daher die Wirkung von Morphin und Morphin-ähnlichen Substanzen auf den Vestibularapparat selbst untersucht werden. Theoretisches und praktisches Interesse besitzen in diesem Zusammenhang die Allyl-Derivate des Morphin (Eckenhoff, Hart, Landmesser u. Unna) und Dromoran (Fromherz u. Pellmont), deren antagonistische Wirkung gegenüber Morphin heute vielfach als Verdrängungsreaktion von gemeinsamen Receptoren gedeutet wird.

Zur Beurteilung pharmakologischer Wirkungen auf die Funktion des N. vestibularis eignen sich die Stell- und Haltereflexe nach Magnus. Die Möglichkeit einer objektiven Registrierung bietet hier der Nystagmus. Dieser äußerst komplizierte Koordinationsvorgang soll ebenfalls, zumindest was seine rasche Phase anbetrifft, in der Formatio reticularis des Hirnstammes lokalisiert sein (Lorente de Nò). Laue und Monnier beschrieben eine Methode zur elektrischen Registrierung des Drehnystagmus am Kaninchen. dal Ri u. Schaefer machten auch gute Erfahrungen mit der oscillographischen Registrierung des nach einseitiger Labyrinthausschaltung entstehenden Dauernystagmus (artefizieller Dauernystagmus) am nichtfixierten Meerschweinchen.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen nun zeigen, daß der artefizielle Dauernystagmus am *nichtfixierten* Meerschweinchen als Testmethode für die Prüfung vestibulär und darüber hinaus allgemein zentralnervös wirksamer Pharmaka brauchbar ist.

Methodik

Als Versuchstiere dienten Meerschweinchen mit einem Gewicht von 300—700 g. Durch einseitige Labyrinthausschaltung mittels Injektionen von Cocain oder Chloroform (Thauer u. Peters, Schaefer 1953) konnte ein Dauernystagmus ausgelöst werden, ohne daß die Tiere hierbei in einer bestimmten Zwangshaltung fixiert werden mußten. Unter der Einwirkung von Cocain zeigten die Meerschweinchen ein ruhigeres Allgemeinverhalten als nach Injektion von Chloroform, das bisweilen zu starken Reizerscheinungen führte. Bei jüngeren Tieren waren die Symptome nach einseitiger Labyrinthausschaltung im allgemeinen lebhafter als bei älteren. Die jüngeren Tiere zeigten stärkere Unregelmäßigkeiten des Nystagmus und Rollbewegungen des Körpers. Diese Bewegungen können sich bei der Ableitung der Augenpotentiale zuweilen störend bemerkbar machen. Ältere Versuchstiere besaßen dagegen den Nachteil, daß die funktionelle Labyrinthausschaltung mit Cocain nicht immer sofort gelang. Der Grund hierfür dürfte in den durch die stärkere Verknöcherung des Schädels verschlechterten Diffusionsbedingungen zu suchen sein. Ein Nachspritzen der Injektionslösung führte aber auch hier schließlich zur Auslösung des Nystagmus.

Die Ableitung der Biopotentiale des Auges (Jung u. Tönnies, Laue u. Monnier, dal Ri u. Schaefer) erfolgte einäugig bipolar. Besondere Beachtung erforderte die Befestigung der Elektroden, da die Ableitung an Tieren vorgenommen wurde, die in ihrer freien Beweglichkeit *nicht* eingeschränkt waren, und infolge der Labyrinthausschaltung spontane Bewegungen des Körpers und vor allem des Kopfes (Kopfnystagmus) zeigten. Folgende Möglichkeiten, um Störpotentiale durch Verschiebung der Elektrodenlage zu verhindern, kamen in Betracht:

1. Eindrehen von Schräubchenelektroden in den das Auge umgebenden Gesichtsknochen. Dieser Weg wurde ungern beschritten, da es sich hierbei um einen nur in Vollnarkose durchzuführenden Eingriff handelt.

2. Plättchen-Elektroden aus Silberblech. Auf der rasierten Haut der Augenumgebung wurden die Elektroden mittels Colophonium (Laue u. Monnier) oder Mastix (dal Ri u. Schaefer) befestigt. Zur besseren Stabilisierung wurde ein Ring aus schnellhärtendem Phosphatzement (Zahnzement) um das Auge gelegt.

3. Durchnähen dünner Drähte. Am besten bewährte sich hier Platindraht von 0,1 mm Stärke, der durch augennahe Cutis genäht und verknotet wurde. Eine Fixierung mit Phosphatzement oder Leukoplaststreifen erhöht noch die Stabilität. Auch diese Technik ist am nicht betäubten Tier schwierig und ohne Lokalanästhesie nicht durchzuführen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die sehr dünnen Drähte nur geringer Beanspruchung ausgesetzt werden können und daher leicht reißen.

4. Einsetzen von kleinen Michel-Klammern in die das Auge umgebende Haut. Diese Methode erwies sich als recht einfach und auch für pharmakologische Reihenuntersuchungen brauchbar. Die Klammern können mit einem Klammersetzer am nicht narkotisierten Tier an den für die Ableitung günstigsten Punkten, die durch die Schlagrichtung des Auges bestimmt sind, schnell und leicht befestigt werden. Durch Überkleben mit Leukoplaststreifen kann die Lage der Elektroden noch zusätzlich gesichert werden.

Grundbedingung bei allen eben beschriebenen Möglichkeiten ist eine flexible Verbindung zwischen Elektroden und Verstärker. Besonders gut eignet sich hierzu HF-Litze, die bei guter Biegsamkeit auch gute Reißfestigkeit besitzt. Es ist zweckmäßig, den Draht zwischen den Ohren hindurch bis auf den Rücken des Versuchstieres zu führen und an beide Punkten mit Leukoplaststreifen zu befestigen. Über eine lange Drahtschleife, die dem Tier freie Beweglichkeit ermöglicht, erfolgt dann der Anschluß an den Verstärker.

Die abgeleiteten Spannungen liegen in der Größenordnung von 100—200 μV, so daß Verstärkungen von 500 tausendfach bis zu einmillionenfach erforderlich werden, um die an den Verstärker angeschlossenen Schreibgeräte ausreichend auszusteuern. Es wurde daher ein mehrstufiger Differentialverstärker benutzt, der bei sehr hoher Verstärkung unter Verwendung rauscharmer Spezialröhren einen genügend großen Störabstand besitzt. Die Röhren wurden „Batterie"-geheizt; die Anodenspannung war auf $1^0/_{00}$ elektronisch stabilisiert. Die Zeitkonstante war größer als 2 sec.

Die Registrierung wurde teils oscillographisch teils mit einem Direktschreiber Oszilloscript (Fa. Philips) durchgeführt[1]. Die direkte Registrierung des Schirmbildes erfolgte mit einer Filmkamera bei abgeschaltetem Kippgerät des Oscillographen und einer Filmlaufgeschwindigkeit von 17 mm/sec. Der Papiervorschub bei Verwendung des Direktschreibers betrug 25 mm/sec.

Zur Auswertung der Versuche wurden Frequenz, Amplitude und Winkelgeschwindigkeit der langsamen Phase des Nystagmus herangezogen. Die Winkelgeschwindigkeit wurde hierbei als Quotient aus Amplitude und Dauer des einzelnen Nystagmus-Impulses berechnet. Es war möglich, in den einzelnen Versuchen statistische Methoden zu verwenden, so daß auch geringe Änderungen, wie sie bei der Testung von Pharmaka auftreten, noch sicher erfaßt werden konnten.

Die bei freisitzenden Meerschweinchen nach einseitiger Labyrinthausschaltung beobachteten Nystagmusformen wurden in einer vorangehenden Arbeit (DAL RI u. SCHAEFER) beschrieben. Es soll daher hier nur auf einige Besonderheiten hingewiesen werden, die zur Auswertung pharmakologischer Untersuchungen wichtig sind.

Sehr leicht kann eine pharmakologische Wirkung vorgetäuscht werden, wenn man die durch zentralnervöse Kompensationsvorgänge und abklingende Cocainwirkung verursachten Veränderungen des artefiziellen Dauernystagmus nicht berücksichtigt. Weiterhin ist nicht zu vergessen, daß konstante Versuchsbedingungen nur bei vollkommen frei sitzendem Tier gewährleistet sind, da der Nystagmus auf passive Veränderung der Kopfstellung und Anlehnung des Tieres an einen festen Gegenstand sehr empfindlich reagiert. Reizeinflüsse, wie Änderung der Lichtverhältnisse, akustische Einwirkungen und Berühren des Tieres, die über den „arousel mechanism" den Wachzustand des Tieres verändern, sind möglichst zu vermeiden. Kurze Zeit nach der Labyrinthausschaltung ist die Intensität des Nystagmus so groß, daß dieser äußeren Reizen gegenüber dominiert und hierdurch kaum verändert wird. Bei abklingendem Nystagmus jedoch macht sich die bestehende asymmetrische Tonuslage bemerkbar. Hier können äußere Reizeinflüsse zu wesentlichen Veränderungen des Nystagmusgeschehens führen. — Spontanschwankungen des Nystagmus müssen als physiologisch angesehen werden, da die Augenbewegungen unter den vorherrschenden Verhältnissen einen komplizierten Vorgang widerspiegeln, in dem viele tonische Impulse und nicht zuletzt die Dynamik des Kopfnystagmus zum Ausdruck kommen. Es ist deshalb von Vorteil, den Kopfnystagmus in die Beobachtung mit einzubeziehen bzw. die Aktionspotentiale der Halsmuskulatur simultan zu registrieren.

Ergebnisse

A. Eigenwirkung von Morphin, Dromoran, Morphin-Antagonisten u. a.

I. Morphium hydrochloricum. Die Morphinwirkung auf den Drehnystagmus des Kaninchens wurde schon von NEAPOLITANO und LONGO geprüft. Diese Autoren fanden bei 5 mg/kg i. p. eine Teillähmung des Nystagmus, eine vollkommene Lähmung bei 50 mg/kg. In Anbetracht

[1] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die freundliche Überlassung der Registriergeräte.

der methodischen Verschiedenheiten war eine erneute Überprüfung der Eigenwirkung des Morphins erforderlich.

Der nach einseitiger Labyrinthausschaltung am Meerschweinchen auftretende Nystagmus ließ unter Morphin eine Abnahme der Frequenz und der Winkelgeschwindigkeit der langsamen Phase erkennen. Oft stieg die Amplitude zunächst etwas an, um bei zunehmender Morphinwirkung unter pendelnden Bewegungen des Auges und dem Verlust der raschen Phase schließlich ganz zu verschwinden. Es handelt sich hierbei in erster

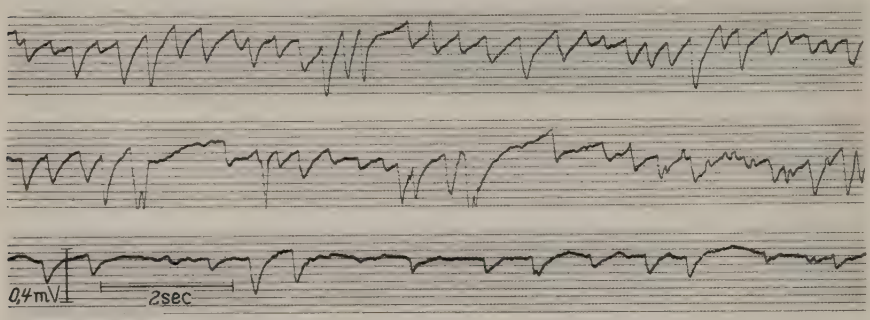


Abb. 1. *Eigenwirkung von Morphin.* a Ausgangswert. b 1 mg/kg Morphin i.p. c 10 min später 10 mg/kg i.p. Es ist deutlich die zweiphasige Morphinwirkung zu erkennen (Erregung in Kurve b und Lähmung in Kurve c). Registrierung: Oscillograph

Linie um eine lähmende Wirkung, die bereits bei noch vergrößerter Amplitude zum Ausdruck kommen kann, sofern die Winkelgeschwindigkeit der langsamen Phase im Abklingen begriffen ist.

Lähmende Effekte traten bereits bei intraperitonealer Injektion von 1 mg/kg auf, eine totale Hemmung beobachteten wir ab 20 mg/kg. Das Wirkungsmaximum wurde bei höheren Dosen etwa nach 15—20 min erreicht. Intravenöse Injektionen von Morphin führten dagegen schon bei 0,1 mg/kg zu einer deutlichen Wirkung, während 5—10 mg/kg ein fast vollständiges Aussetzen der Augenbewegungen zur Folge hatten.

Bei vielen Tieren konnte eine zweiphasische Wirkung beobachtet werden (Abb. 1), besonders bei jüngeren Meerschweinchen unter 500 g Gewicht. Einer Erregung der Atmung (Frequenzsteigerung) entsprach im Nystagmogramm teils eine echte Intensitätssteigerung mit Frequenzbeschleunigung und Vergrößerung der Amplitude, teils eine Irregularität mit Verlust der typischen Nystagmusformen. Bei intraperitonealer Injektion konnte dieses Stadium der Erregung bei höheren Dosen (über 5 mg/kg) in den ersten 5—10 min beobachtet werden. Daran schloß sich dann das Stadium der eigentlichen Morphinlähmung mit einem gedämpften und zunächst regularisiertem Nystagmus an. Diese beschriebenen Veränderungen waren bis zu einem gewissem Grade vom Zeitpunkt der Injektion des Alkaloides nach Ausschaltung des Labyrinthes abhängig.

II. Dromoran (3-Hydroxy-N-methylmorphinan-tartrat). Als Muttersubstanz des Morphin-Antagonisten Lävallorphan (-)-3-Oxy-N-allylmorphinan) wurde auch Dromoran mit in die Untersuchungen einbezogen. Die Wirkung dieser Substanz auf den Nystagmus im Vergleich zum Morphin entsprach nicht ihrem stärkeren analgetischen Effekt (Schaumann). Das Nystagmogramm ließ bei 1 mg/kg i. p. eine leichte Dämpfung erkennen, die keineswegs der Hemmwirkung einer entsprechenden stärkeren Morphindosis gleichkam. Injektionen von 5 bis 10 mg/kg i. p. hatten eine ausgeprägtere Hemmung des Nystagmus zur Folge, die nach etwa 15—20 min ihren Höhepunkt erreicht hatte.

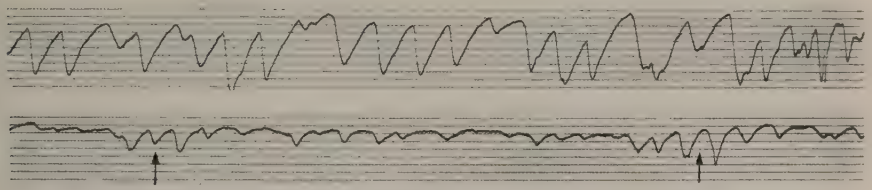


Abb. 2. *Eigenwirkung von Lävallorphan.* a Ausgangswert. b 1 mg/kg Lävallorphan i. p. Nach 5 min fast vollständiger Verlust der rhythmischen Augenbewegungen. Vereinzelt auftretende Nystagmusschläge in Kurve b sind durch den noch nicht ganz erloschenen Kopfnystagmus bedingt. Registrierung: Oscillograph. Eichung s. Abb. 1

Auch hier wurden Frequenzverlangsamung und Verkleinerung der Amplitude beobachtet, bei kleineren Dosen auch eine Regularisierung unruhiger Ausgangswerte. In einigen Versuchen trat bei 5 bis zu 20 mg/kg eine dem Morphin entsprechende zweiphasische Wirkung auf.

III. Nallorphin (Nor-allyl-morphin) und Lävallorphan (Nor-allyl-Dromoran). Die Eigenwirkungen des Morphinabkömmlings Nallorphin und des Lävallorphan, zeigten bei der Prüfung am Nystagmus, daß die Substitution mit einem Allylrest bei Morphin und Dromoran zu Unterschieden in der Wirkung führt, die dem analgetischen Effekt sogar entgegengesetzt verlaufen können.

Bei nahezu aufgehobener analgetischer Wirkung (Fromherz u. Pellmont) machte sich in den eigenen Versuchen die lähmende Wirkung auf den Nystagmus besonders stark bemerkbar. Nallorphin beeinträchtigte den Nystagmus bei Dosen von 1 mg/kg i. p. bereits kurzfristig (Abb. 2). Bei intravenöser Injektion war die Beeinträchtigung in Form einer Dämpfung schon bei 0,1 mg/kg zu erkennen. Eine noch stärkere Lähmung verursachte das Lävallorphan. Dosen von 1 mg/kg i. v. verminderten die Intensität des Nystagmus für 5—10 min. In den meisten Versuchen beobachteten wir als Wirkungsmaximum einen vollkommenen Verlust der rhythmischen Augenbewegungen.

IV. Megaphen (N-[3′-Dimethylamino-propyl]-3-chlor-phenothiazin) und Atropin. Megaphen besitzt als zentralnervöses Sedativum und Antihistaminicum ein gewisses Interesse zur Bekämpfung der Nebenwirkungen

des Morphins. Ebenfalls muß dem Atropin als einem Parasympathicolyticum, eine gewisse antagonistische Wirkung zugesprochen werden, insbesondere beim Morphinerbrechen. Bei Prüfung dieser Stoffe am Drehnachnystagmus des Kaninchens durch Neapolitano u. Longo konnten keine ausgeprägte Eigenwirkung festgestellt werden.

Die eigenen Versuche zeigten, daß Megaphen den artefiziellen Dauernystagmus bei 0,5 mg/kg i.p. im Sinne einer leichten Intensitätsminderung und Regularisierung beeinflussen kann. In einigen Versuchen gelang es, die durch den Kopfnystagmus verursachten periodischen Schwankungen von Frequenz und Amplitude mit 1 mg/kg i.p. zu beseitigen (Abb. 3).

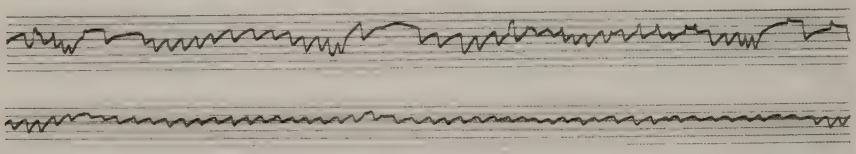


Abb. 3. *Eigenwirkung von Megaphen.* a Ausgangswert: periodisches Schwanken von Frequenz und Amplitude. b 1 mg/kg Megaphen i.p. Nach 5 min Regularisierung des gesamten Nystagmus. Verminderung der Amplitude und der Winkelgeschwindigkeit. Registrierung: Oscillograph. Eichung s. Abb. 1

5 bis 10 mg/kg i.p. verminderten schon deutlich die Frequenz und Amplitude, während eine vollkommene Lähmung erst mit sehr hohen Dosen erzielt werden konnte.

Bei der Verwendung von Atropin wurde der Nystagmus erst mit Dosen von 5 bis 10 mg/kg i.p. in ganz geringem Maße beeinträchtigt. Der Kopfnystagmus konnte auch bei derartig hohen Dosen immer noch nachgewiesen werden.

B. Antagonistische Wirkungen

Der eindeutige Beweis einer pharmakologisch antagonistischen Wirkung in Form der „competitiv reaction" setzt im Idealfall folgende Bedingungen voraus: 1. Ausgeprägte Eigenwirkung des aufzuhebenden Pharmakon, 2. sehr geringe Eigenwirkung des Antagonisten.

Bei der Prüfung der Morphin-Antagonisten waren diese Forderungen nur schwer zu erfüllen. Einerseits war die Eigenwirkung des Morphins auf den Nystagmus nicht sehr ausgeprägt, es sei denn in sehr hohen Dosen, die bereits mit unspezifischen Effekten verbunden waren; andererseits bedaßen die als Antagonisten in Frage kommenden Stoffe wie Nallorphin und Lävallorphan bei geringer Dosierung selbst ausgesprochen lähmende Wirkungen. Der optimale Nachweis eines antagonistischen Effektes gegenüber Morphin war also nur in begrenzten Dosenverhältnissen zu erwarten.

I. Bei der Verwendung von Nallorphin als Antagonist war ein Zehntel der Morphindosis erforderlich, um die durch Morphin verursachte

Lähmung des Nystagmus zu durchbrechen. Wenn mit 5 mg/kg Morphin i. p. eine ausreichende Eigenwirkung erzielt wurde, ließ sich mit 0,5 mg/kg i. p. Nallorphin wieder eine Beschleunigung der Frequenz und Vergrößerung der Amplitude der raschen Phase herbeiführen. Bei 20 mg/kg i. p. war der Antagonismus nur noch im ganz geringem Maße nachzuweisen, da die äquivalenten Nallorphinmengen bereits eine lähmende Eigenwirkung besaßen.

II. Günstiger lagen die Verhältnisse bei der antagonistischen Wirkung von Lävallorphan. Ein Hundertstel der Morphindosis als antagonistisches Äquivalent genügte hier bereits, um die durch Morphin verursachten Lähmungen aufzuheben (Abb. 4). Es gelang sogar in einigen Versuchen

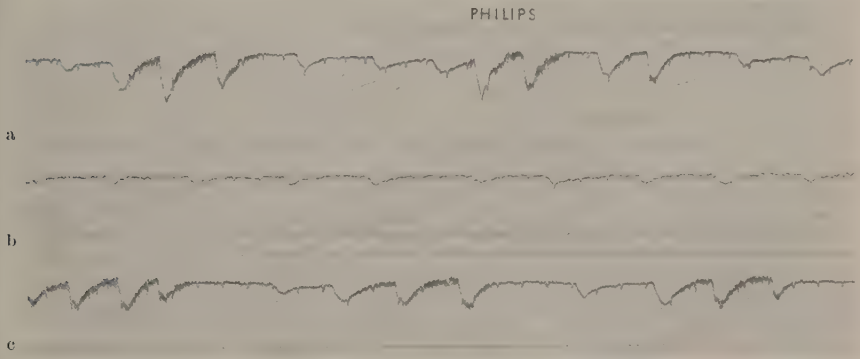


Abb. 4. *Morphin-Lävallorphan-Antagonismus (120:1) im Lähmungsstadium.* a Ausgangswert: periodisches Schwanken von Frequenz und Amplitude. Halsmuskelpotentiale der raschen Phase des Kopfnystagmus superponiert. b 12 mg/kg Morphin i. v. in drei Dosen von je 4 mg im Abstand von 2 min. Nach 10 min völlige Lähmung der Augenbewegungen. c 0,1 mg/kg Lävallorphan i. v. Bei gleichzeitiger Aktivierung des Augennystagmus Wiederauftreten der superponierten Halsmuskelpotentiale als Ausdruck des Kopfnystagmus. Registrierung: Direktschreiber. Eichung s. Abb. 4

selbst bei vollkommener Lähmung des Nystagmus mit einem Zweihundertstel der Morphindosis eine leichte Reaktivierung herbeizuführen: So konnte z. B. die durch 20 mg/kg i. p. erzeugte Hemmung des Nystagmus durch 0,1—0,5 mg/kg i. p. Lävallorphan sicher beeinflußt werden. Bei höheren Morphindosen bis zu 50 mg/kg i. p. war teilweise noch eine Wiederkehr der raschen Phase erkennbar. In Anbetracht der Lävallorphan-Eigenwirkung ließen sich Dosen über 1 mg/kg nicht mehr prüfen.

Exakter konnte der Morphin-Lävallorphan-Antagonismus bei intravenöser Applikation nachgewiesen werden (Abb. 5) Mit 0,0005 mg/kg i.v. Lävallorphan konnte die durch 0,1 mg/kg Morphin i.v. ausgelöste Aktivierung bzw. Irregularität (Stadium der Erregung), die meist auch mit einer Frequenzsteigerung der Atmung verbunden ist, sofort beseitigt werden. In einigen Versuchen führte die langsame zweimalige Injektion von 5 mg/kg i. v. Morphin zur totalen Hemmung der Augenbewegungen. Während bei Lävallorphan-Dosen von 0,05 mg/kg i.v. die Reaktivierung

nur schwach ausgeprägt war, so konnte mit Mengen von 0,1 mg/kg i.v. diese Hemmung fast vollständig beseitigt werden.

Besonders eindeutige Ergebnisse lieferten bei diesen Untersuchungen etwas ältere Tiere, die auf Morphin weniger empfindlich reagierten und mit kleineren Dosen mehrere Stunden vor der eigentlichen Untersuchung vorbehandelt waren. Es ist zu vermuten, daß in diesem Falle ein Teil der unspezifischen Nebenwirkungen des Morphin wie z.B. die Freisetzung von Histamin auf tachyphylaktischem Wege ausgeschaltet war.

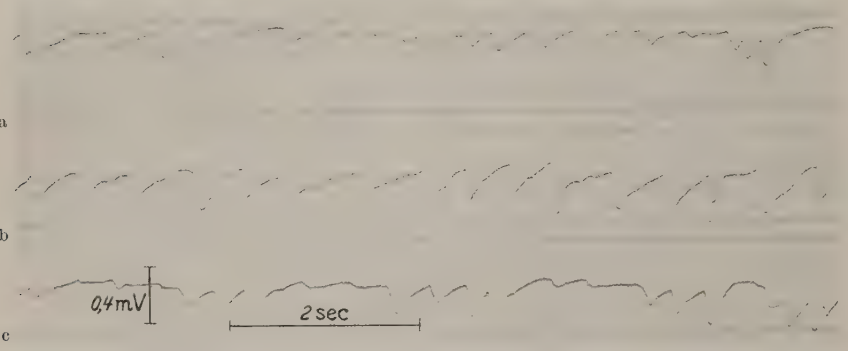


Abb. 5. *Morphin-Lävallorphan-Antagonismus (200:1) im Erregungsstadium.* a Ausgangswert: periodisches Schwanken von Frequenz und Amplitude. b 0,1 mg/kg Morphin i.v. Nach 3 min Stadium der Morphinerregung. c 2 min nach 0,0005 mg/kg Lävallorphan i.v. Deutlicher Antagonismus. Die Ausgangslage ist wiederhergestellt. Registrierung: Direktschreiber

Nach der Vorbehandlung mit Luminal (Phenyläthylbarbitursäure) 20 mg/kg i.p. gelang es, die durch zusätzliche Injektion von 1 bis 2 mg/kg i.p. Morphin hervorgerufene Lähmung des Nystagmus durch Lävallorphan-Dosen von 0,01 bis 0,1 mg/kg i.p. teilweise zu beheben.

Sollten kleinere Morphin-Dosen und ihr Antagonismus geprüft werden, so erwies es sich als vorteilhaft, den anfänglich heftigen Nystagmus kurz nach der Labyrinthausschaltung auf eine ruhigere Ausgangslage abklingen zu lassen und die Untersuchungen erst dann vorzunehmen.

Schwierigkeiten in der Beurteilung der antagonistischen Wirkung konnten bei vorhandenem Kopf-Nystagmus auftreten, der ja einen aktivierenden Einfluß auf die Augenbewegungen besitzt. Dies hat zur Folge, daß bei einem durch Morphininjektion gelähmten Versuchstier nach der Applikation von Lävallorphan der Kopf-Nystagmus zuerst wieder in Erscheinung tritt und dieses wiederum seinerseits einen kurzzeitigen Augennystagmus auslöst. Erst bei vollem Antagonismus kommt dann die eigentliche Augenbewegung wieder zur Geltung.

III. Die antagonistische Wirkung von Megaphen und Atropin (Abb. 6) war nicht sehr überzeugend. Es konnte lediglich die erregende Komponente kleiner Morphindosen (0,1 mg/kg i.v.) durch Megaphen aufgehoben werden. Vorbehandlung mit

Megaphen, auch in höheren Dosen, hinterließ keine Schutzwirkung gegen lähmende Morphineinflüsse. Es ist allerdings bemerkenswert, daß der durch Morphin teilweise gelähmte Nystagmus durch nachfolgende Injektionen von Megaphen (1 mg/kg) in seiner Form verändert werden konnte. Bei abnehmender Frequenz wurde in einigen Versuchen die Amplitude wieder größer, während die langsame Phase schneller als vorher zur Ausgangslage (Deviationsstellung) zurückkehrte. Der Form nach bildete sich also ein „hüpfender" Nystagmus aus (s. FRENZEL). Wie weit in diesem Falle lähmende oder erregende Wirkungen vorliegen, ist schwer zu sagen.

Durch Atropin war die lähmende Morphinwirkung nicht zu beseitigen. In einigen Versuchen war der Atropineinfluß nach Morphinlähmung andeutungsweise vorhanden. Höhere Atropin-Dosen blieben auch hier ohne Erfolg.

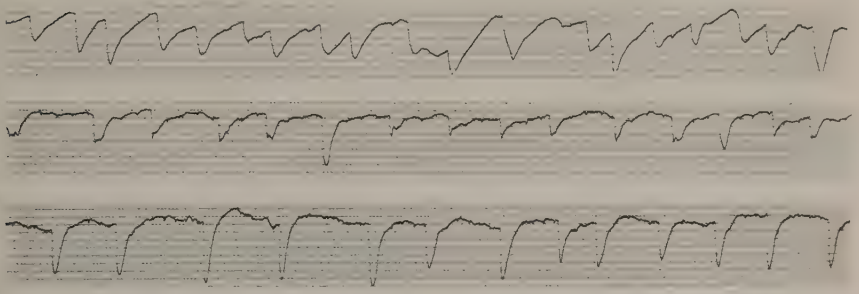


Abb. 6. *Antagonistische Wirkung des Megaphen.* a Ausgangswert. b 10 mg/kg Morphin i.p. Nach 6 min deutliche Dämpfung des Nystagmus mit Verminderung von Frequenz und Amplitude. c Nach weiteren 15 min 4 mg/kg Megaphen i.p. Bei weiter zunehmender Frequenzverlangsamung starke Vergrößerung der Amplitude und Winkelgeschwindigkeit (vgl. Text). Registrierung: Oscillograph. Eichung s. Abb. 1

Diskussion

Zentralnervös wirksame Pharmaka, die keine ausgesprochenen narkotischen Eigenschaften besitzen, beeinflussen den Nystagmus im allgemeinen wenig. Ohne den Wachzustand des Versuchstieres zu ändern, üben nur vereinzelte Stoffe eine spezifische Wirkung auf den Vestibularapparat aus. Wenn Morphin und Megaphen, die im engeren Sinne nicht zu den Narkoticis zählen, in verhältnismäßig geringer Dosierung wirksam waren, so liegt dies wohl hauptsächlich in der Methode begründet.

Das Nystagmusgeschehen am *freisitzenden* Meerschweinchen nach einseitiger Labyrinthausschaltung ist der Ausdruck eines komplizierten biologischen Mechanismus und kann daher als empfindliche pharmakologische Testmethode herangezogen werden. Die kontinuierliche Registrierung des Nystagmus gestattet es hierbei, den Ablauf einer pharmakologischen Einwirkung in allen Stadien voll zu erfassen.

Von besonderem pharmakologischem Interesse war bei unseren Morphinuntersuchungen die Beobachtung eines zweiphasischen Wirkungsverlaufes. Die bekannte Tatsache des Erbrechens nach Morphinapplikation sowie die Schutzwirkung gegen andere Brechmittel nach längerer Einwirkung des Pharmakon läßt auf gewisse Zusammenhänge mit dem Nystagmus schließen. Da sowohl die labyrinthäre Reizung

Erbrechen hervorrufen kann (See-, Luft-, Autokrankheit), andererseits aber auch das Morphinerbrechen bei vestibulären Reizzuständen, allein schon bei aufrechter Körperhaltung, häufiger auftritt, möchten wir in der erregenden Phase der Morphinwirkung auf den Nystagmus ein Äquivalent des Morphinerbrechens erblicken. Ebenso könnte die Schutzwirkung gegen andere Brechmittel zum Teil auf eine Untererregbarkeit des Vestibularapparates in der lähmenden Phase der Morphinwirkung bezogen werden.

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß auch bei der Atmung die zweiphasische Wirkungsweise zum Ausdruck kommt. Der gemeinsame Wirkungscharakter hinsichtlich Nystagmus, Erbrechen und Atmung findet seine Erklärung, wenn man bei den genannten Vorgängen als gemeinsames zentralnervöses Substrat des unteren Hirnstammes die Formatio reticularis mit in Betracht zieht, die ebenfalls als ein wesentlicher Angriffspunkt des Morphin gilt (s. Borrison u. Wang). Als Ursache der Erregung könnte allerdings auch die Histaminausschüttung wirksam werden. Dem aber ist entgegen zu halten, daß durch kleine Lävallorphan-Dosen die Morphinerregung aufgehoben werden kann. Die Kreislaufwirkung bleibt dagegen unbeeinflußt (Kempe).

Bemerkenswert ist ferner, daß der analgetische Effekt der geprüften Substanzen (s. Schaumann) in keiner Weise den hier erhobenen Befunden entspricht. Zeigte schon das Dromoran keine nennenswerten Wirkungsunterschiede gegenüber dem Morphin, so war die ausgesprochene lähmende Wirkung des Nallorphin und insbesondere des Lävallorphan überraschend. Die Substitution der N-ständigen Methylgruppe durch einen Allylrest hat eine recht spezifische Umwandlung des Wirkungscharakters dieser Stoffe zur Folge. Die bereits von Fromherz u. Pellmont beschriebene nahezu vollständige Aufhebung der analgetischen Komponente ist mit einer bisher unbekannten, besonders starken Wirkung auf den Vestibularapparat verbunden, die bei den Abkömmlingen der Morphinreihe noch nicht nachgewiesen worden war. Sollte es sich hierbei um einen vorwiegend auf vestibuläre Zentren gerichteten Einfluß handeln, so wäre damit vielleicht auch eine klinische Anwendungsmöglichkeit in der Behandlung der Kinetosen gegeben.

Die zur Klärung des Morphinantagonismus durchgeführten Versuche sind hinsichtlich der Dosenverhältnisse beachtenswert. Nallorphin ließ eine antagonistische Wirkung bei einem Zehntel der Morphin-Dosis und Lävallorphan bei einem Hundertstel und weniger erkennen. Miller, Gilfoie u. Schiedemann beschrieben gleiche Verhältnisse bei der Atmung und deuteten ihre Befunde als eine mögliche „competitiv inhibition". Diese Reaktionsform wurde bereits von Pohl anläßlich seiner Entdeckung des Morphinantagonisten N-allyl-norcodein vermutet und neuerdings von Zindler u. Ganz u. a. auch für Lävallorphan

wahrscheinlich gemacht. Die eigenen Versuche ließen sich quantitativ nicht genügend variieren. Sie sprechen aber auch im Sinne einer kompetitiven Reaktionsweise, da äußerst geringe antagonistische Dosen von Lävallorphan mit hemmender Eigenwirkung eine Morphinlähmung durchbrechen können.

Die antagonistischen Effekte von Megaphen und Atropin waren dagegen sehr gering. Im wesentlichen ließ sich nur die erregende Morphinwirkung durch Megaphen beeinflussen. Das entsprach durchaus den Beobachtungen an der Katze, wonach die durch Morphin ausgelöste Erregung mit Megaphen in hohen Dosen unterdrückt werden kann (Schaefer nicht veröffentlicht).

Der Befund, daß Lävallorphan die Morphinwirkung auf den Vestibularapparat in sehr geringen Dosen beeinflussen kann, besitzt auch ein praktisches Interesse, da die analgetische Morphinkomponente erst bei hohen Dosen beeinträchtigt wird. Es besteht damit die Möglichkeit, nicht nur die lästige atemlähmende Wirkung auszuschalten, sondern auch die von Seiten des Vestibularapparates ausgelösten Nebenwirkungen des Morphin zu vermindern. Die kurze Wirkungsdauer des Lävallorphan fällt hierbei kaum ins Gewicht, da bekanntlich das Morphinerbrechen besonders in der Initialphase der Morphinwirkung auftritt.

Summary

After unilateral labyrinth-lesion the eye-movements of guinea pigs were recorded oscillographical. The pharmacological action of some drugs (Morphine and Morphine-antagonists) was tested. There was a diphasic effect of Morphine on the vestibular nystagm, an activating component preceding a paralysis one. This might be a pharmacological equivalent to the well known diphasic emetic action of Morphine. Le vorphane and Levallorphane were found to have a distinct antagonistic effect against the Morphine-induced vesticbular reaction. Little or none antagonistic effect was produced by Chlorpromazine and Atropine. A probable competitiv mechanism of Levorphane and Levallorphane is discussed. An interesting additional observation is that Levallorphane has a strong but transient paralysing effect on the vestibular function.

Literatur

Borrison, H. L., and S. C. Wang: Pharmacol. Rev. **5**, 193 (1953).

Eckenhoff, J. E., G. L. Hoffmann and R. D. Dripps: Anesthesiology **13**, 242 (1952).

Eckenhoff, J. E., I. D. Elder and B. D. King: Amer. J. med. Sci. **222**, 191 (1952); **223**, 115 (1952).

Frenzel, H.: Z. Hals-, Nas.- u. Ohrenheilk. **21**, 117 (1928). — Passow-Schaefers Beitr. **28**, 305 (1930).

Fromherz, K., u. B. Pellmont: Experientia (Basel) **8**, 394 (1952). — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **218**, 136 (1953).

Goodmann, L. S., and A. Gillmann: The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York 1955, S. 225.

HART, E. R.: J. Pharmacol. exp. Ther. **72**, 19 (1951). — Fed. Proc. **2**, 82 (1943).
HART, E. R., and E. L. MCCAWLEY: J. Pharmacol. exp. Ther. **82**, 339 (1944).
JUNG, R., u. I. F. TÖNNIES: Klin. Wschr. **26**, 513 (1948).
KEMPE, H. D.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **223**, 541 (1954).
LANDMESSER, C. M., S. COBB and J. G. CONVERSE: Anesthesiology **14**, 535 (1953).
MILLER, I. W., T. M. GILFOIE u. F. E. SCHIDEMANN: J. Pharmacol. exp. Ther. **115**, 350 (1955).
MONNIER, M., u. H. LAUE: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **217**, 82 (1953).
NEAPOLITANO, L., et V. G. LONGO: Arch. int. Pharmacodyn. **90**, 343 (1952).
DE NÒ, R. L.: Ergebn. Physiol. **32**, 73 (1931). — J. Neurophysiol. **1**, 207 (1938).
POHL, J.: s. KEMPE, H. D. (1954).
DAL RI, H., u. K.-P. SCHAEFER: Pflüg. Arch. ges. Physiol. **265**, 125 (1957).
RUBIN, A., and J. WINSTON: J. clin. Invest. **29**, 1261 (1950).
SCHAEFER, K.-P.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **226**, 505 (1953); **228**, 556 (1956).
SCHAUMANN, O.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **216**, 48 (1952).
THAUER, R., u. G. PETERS: Pflüg. Arch. ges. Physiol. **239**, 483 (1938).
UNNA, K.: J. Pharmacol. **79**, 27 (1943).
ZINDLER, M., u. P. GANZ: Dtsch. med. Wschr. **80**, 410 (1955).

Dr. H. DAL RI, Pharmakol. Institut der Universität Göttingen, Geiststraße 9
Dr. K.-P. SCHAEFER, Universitäts-Nervenklinik, Göttingen, von Sieboldstraße

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 91—101 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Der Antagonismus verschiedener Sympatholytica gegenüber dem inhibitorischen Adrenalin- oder Noradrenalineffekt am elektrisch gereizten Meerschweinchenileum

Von
G. Härtfelder, G. Kuschinsky und K. H. Mosler

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. April 1958)

Obwohl es seit 1925 mehreren Autoren gelang, einen Antagonismus verschiedener Sympatholytica gegenüber hemmenden Adrenalineffekten aufzuzeigen, vertrat Nickerson (1949) in einer Übersicht über die Pharmakologie der adrenergischen Blockade dennoch die klassische Auffassung Dales (1906), daß die inhibitorischen Adrenalinwirkungen im Gegensatz zu den excitatorischen durch die bekannten Sympatholytica nicht blockierbar seien. Nach seinem Urteil ist die Spezifität der beobachteten antagonistischen Effekte nicht gesichert, ja unwahrscheinlich, weil positive Befunde fast nur an einem Organ, dem isolierten Kaninchendarm, erzielt und weil für die Gruppe der Sympatholytica vom Typ der β-Haloalkylamine überhaupt keine Nachweise für einen Antagonismus gegenüber inhibitorischen Adrenalinwirkungen erbracht werden konnten.

Das isolierte Ileum des Meerschweinchens wurde bisher nur selten für diese Untersuchungen herangezogen. Positive Befunde ergaben sich nur bei der Prüfung des peristaltischen Reflexes (Planelles 1925; Rothlin 1929). Die Ergebnisse am einfachen Magnus-Präparat waren dagegen negativ oder wenig überzeugend (Müller 1945; Rothlin 1925; Nickerson u. Goodman 1947). Es blieb daher die Frage offen, ob es an diesem Präparat mit Hilfe der elektrischen Reizung gelingen würde, den inhibitorischen Adrenalineffekt durch Sympatholytica aufzuheben und ob ein solcher Antagonismus auch mit dem bisher unwirksam befundenen Dibenamin nachzuweisen sein würde.

Methodik

4—6 etwa 3 cm lange Stücke vom Ileum des Meerschweinchens wurden in je einem Organgefäß, in dem sich 10 ml O_2-durchperlte Tyrode-Lösung befanden, gleichzeitig elektrisch gereizt. Die Kontraktionen wurden über Stirnschreiber mit einer Hebelübertragung von 1:5 und einer Vorspannung von 1,3 g auf Rußkymographien registriert.

Als Stromquelle für die elektrische Reizung diente der Netzwechselstrom, von dem über eine Potentiometerschaltung Spannungen von 0,9—1,0 V/cm Elektrodenabstand abgezweigt wurden. Die Organstücke hingen frei zwischen je zwei in dem Bad angebrachten Ringelektroden aus Platindraht. Der Elektrodenabstand betrug 4 cm. Die eine Elektrode befand sich etwas oberhalb, die andere etwas unterhalb des Darmstückes. Die Reizdauer betrug 4 sec, der zeitliche Abstand der einzelnen Reize ½ min. Nach einer Serie von jeweils 4 Reizen wurde die Badflüssigkeit gewechselt und eine Pause von 4 min eingelegt. Einzelheiten über die Methodik siehe in der vorangehenden Arbeit (Härtfelder, Kuschinsky u. Mosler 1958).

Es wurden folgende Substanzen untersucht: Adrenalin (Suprarenin, Hoechst), Noradrenalin (Arterenol, Hoechst), Tolazolin (Priscol, Ciba), Phentolamin (Regitin, Ciba), N,N-Dibenzyl-β-chloräthylamin (Dibenamin, Nordmark), Dihydroergotamin (Sandoz) und Papaverinum hydrochl. (Ingelheim)[1].

Adrenalin und Noradrenalin wurden jeweils 1 min vor Beginn einer Reizserie der Badflüssigkeit zugegeben. In gleichmäßigen Abständen wurde der Adrenalin- bzw. Noradrenalineffekt mehrmals wiederholt, bis eine gleichförmige Reizantwort gesichert war. In den anschließenden Kombinationsversuchen wurde verschieden vorgegangen. Priscol konnte wegen seiner guten Auswaschbarkeit zweimal und öfter gegeben werden, so daß es möglich war, zunächst die Eigenwirkung und danach die antagonistische Wirkung zu untersuchen. Priscol wurde 1 min vor Adrenalin bzw. 2 min vor einer Reizserie dem Bad zugegeben. Bei den drei anderen schlechter auswaschbaren Sympatholytica mußte eine Kontrolle auf Eigenwirkung während des Kombinationsversuches erfolgen. Zu diesem Zweck wurde das Sympatholyticum 8 min vor Adrenalin dem Bad zugefügt, so daß zwischen Sympatholyticum und Adrenalin eine der in konstantem Rhythmus alle 6 min erfolgenden Reizserien eingeschaltet war. Anschließend an den Kombinationseffekt wurde Adrenalin in gleichen Zeitabständen wie vorher geprüft, um die Dauer der antagonistischen Beeinflussung zu bestimmen. Da zwischendurch regelmäßig Kontrollreizungen ausgeführt wurden, konnten auch langsam einsetzende Eigenwirkungen des Antagonisten mit Sicherheit erfaßt werden.

Wir untersuchten mit der von Schild (1947) angegebenen Methode der Bestimmung des pA_2 den Adrenalin- bzw. Noradrenalinantagonismus zu Priscol, um die Brauchbarkeit der Methode der elektrischen Reizung für quantitative Untersuchungen antagonistischer Reaktionen zu prüfen. Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen bietet die Methode von Schild besondere Vorteile, weil die bei diesem Vorgehen zu errechnende Maßzahl (pA_2) innerhalb weiter Grenzen nicht von der jeweiligen Konzentration des Agonisten beeinflußt wird. Der pA_2 bedeutet den negativen Logarithmus der Konzentration des Antagonisten, bei der die Wirkung einer Verdoppelung des Agonisten gerade aufgehoben wird. Nach Schild genügen 6 Einzelbestimmungen, um den pA_2 als Maßzahl der Stärke der antagonistischen Wirksamkeit festzulegen.

Zur Bestimmung dieses Wertes wurde zunächst mehrmals die Wirkung einer Adrenalindosis registriert, die eine Hemmung von etwa 50% auslöste. Wenn nach dem Auswaschen das Ausgangsniveau wieder erreicht worden war, wurde 2 min vor der folgenden Reizserie Priscol gegeben und 1 min später die doppelte Dosis Adrenalin. Das gleiche wurde anschließend mit einer anderen Priscolkonzentration wiederholt, und zwar wurden die beiden Priscoldosen so gewählt, daß einmal die Wirkung der Verdoppelung der Adrenalindosis nicht ganz aufgehoben war, während das andere Mal der Effekt der doppelten Adrenalindosis etwas schwächer war als bei der einfachen Dosis.

[1] Wir danken den Firmen für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

Die Differenz zwischen dem Mittelwert der Kontrolleffekte und dem Kombinationseffekt wurde in Prozent der Ausgangslage gemessen und das Ergebnis beider Versuche zu einem Wertepaar zusammengestellt. Daraus wurde je ein pA_2 berechnet. Die Ermittlung der einzelnen pA_2 kann praktisch ohne Einbuße an Genauigkeit graphisch vorgenommen werden (Abb. 1). Rechnerisch läßt sich der einzelne pA_2-Wert in Form einer Dreisatzaufgabe bestimmen:

$$\frac{x}{a-b_2} = \frac{D_1-D_2}{b_1-b_2}; \qquad Ap_2 = x + D_2.$$

(Erklärung der Symbole siehe Legende zu Abb. 1).

Ergebnisse

I. Adrenalin und Noradrenalin vermindern die durch elektrische Reizung ausgelösten Kontraktionen. Die Größe dieses Effektes ist abhängig von der Stärke des Stromdurchganges; je größer die angelegte Spannung, desto geringer die Veränderung der Reizantwort unter Adrenalin bzw. Noradrenalin. Wir arbeiteten deshalb mit submaximalen Reizstärken, mit denen Kontraktionen von 6—12 mm (entsprechend einer Schreibhöhe von 30—60 mm auf dem Rußkymographion) erzielt wurden. Unter diesen Bedingungen erhielten wir nach Adrenalin oder ähnlich nach Noradrenalin in einem Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-7} g/ml dosisabhängig eben erkennbare bis maximale Hemmeffekte (Abb. 2). Der stärkste Grad der Depression stellte sich 40—180 sec nach der Zugabe zum Bad ein. Gelegentlich wurde anschließend eine kurzdauernde Phase mit größeren Kontraktionen beobachtet. Die Adrenalinwirkung ließ sich mehrmals quantitativ reproduzieren. Erst im Laufe eines mehrstündigen Versuches kam eine allmähliche Abnahme der Empfindlichkeit zustande.

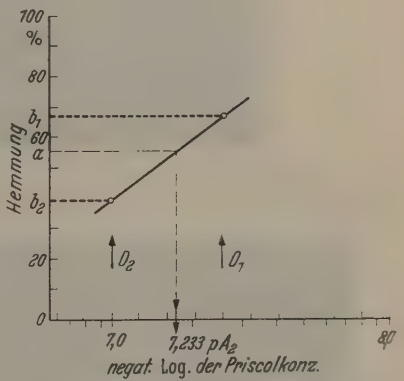


Abb. 1. Beispiel der graphischen Bestimmung eines pA_2-Wertes. D_1 und D_2 Priscolkonzentration $1:2{,}5 \cdot 10^7$ und $1:10^7$, als neg. Log. ausgedrückt 7,398 und 7,000. a Kontraktionshemmung durch Adrenalin in einer Konzentration von $1:2 \cdot 10^8$. b_1 und b_2 Kontraktionshemmung durch die doppelte Adrenalindosis ($1:10^8$) nach der Priscolvorbehandlung D_1 und D_2. Der gefundene pA_2 ist 7,233, entsprechend einer Priscolkonzentration von $1:1{,}7 \cdot 10^7$

II. Die Aufhebbarkeit der Adrenalin- und in einigen Versuchen auch der Noradrenalinhemmung wurde mit 4 Sympatholytica: Dibenamin, Dihydroergotamin, Regitin und Priscol geprüft.

1. Nach einer Latenzzeit von 10—15 min ließ sich mit *Dibenamin* eine deutliche Hemmung des Adrenalineffektes zeigen (Abb. 3). Das hierzu notwendige Dosenverhältnis betrug etwa 100:1, d. h. die absolute

Dibenaminkonzentration lag bei $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml. Die Blockade war unter diesen Umständen irreversibel.

Da bisher ein Dibenaminantagonismus nicht beschrieben worden ist, haben wir diesen Effekt eingehend untersucht. In Abb. 4 ist die Verschiebung der Dosiswirkungskurve von Adrenalin um eine Zehnerpotenz

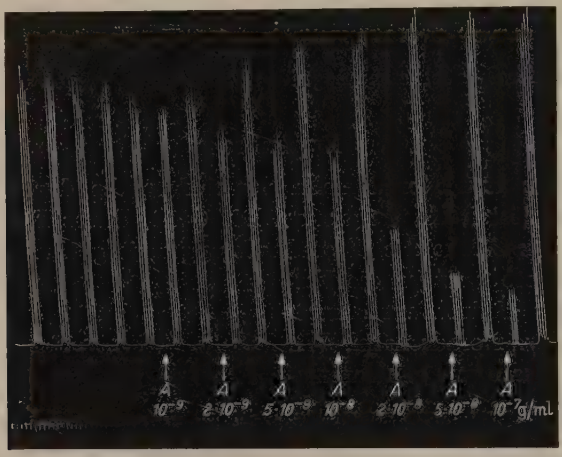


Abb. 2. Die Wirkung von Adrenalin am elektrisch gereizten Ileum des Meerschweinchens. Reizstärke 1 V/cm; Reizdauer 4 sec; Reizfrequenz 50 Hz Wechselstrom; Abstand der Einzelreize $^1/_2$ min; Reizpause 4 min. Bei Beginn der Reizpause jeweils 2maliger Wechsel der Badflüssigkeit. *A* Adrenalin

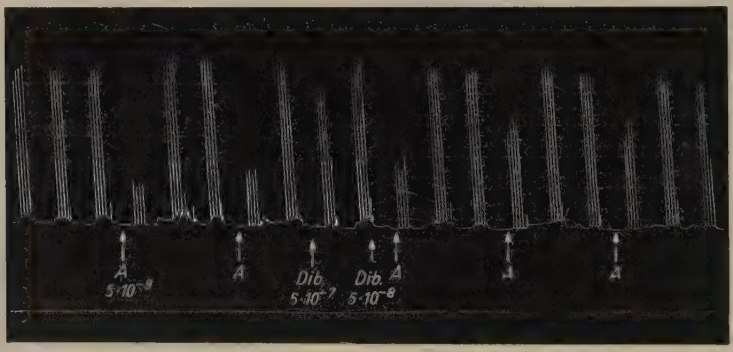


Abb. 3. Die antagonistische Wirkung von Dibenamin gegen Adrenalin.
A Adrenalin; *Dib.* Dibenamin. Weitere Erklärungen siehe Legende zu Abb. 2

und mehr nach der Einwirkung von Dibenamin dargestellt. Bei Anwendung der höheren Dibenaminkonzentration zeigt sich eine Abflachung der Dosiswirkungskurve, deren Veränderung gegenüber der (einfachen) Adrenalinkurve statistisch signifikant ist ($P < 0{,}05$). Eine weitere Steigerung der Dibenamindosis war nicht möglich, da schon bei einer Konzentration von 10^{-6} g/ml gelegentlich länger anhaltende Eigenwirkungen in Form von Kontraktionshemmungen auftraten. Auch in

niedrigeren Konzentrationen fand sich manchmal eine kurze Depression, die aber bis zum Zeitpunkt der Adrenalinprüfung wieder abgeklungen war. Eine durch Papaverin hervorgerufene Kontraktionshemmung, die in ihrer Stärke etwa dem Adrenalineffekt entsprach, wurde weder durch Dibenamin noch in den folgenden Versuchen mit anderen Sympatholytica beeinflußt, so daß eine unspezifische Wirkung ausgeschlossen werden konnte.

2. Der Nachweis eines Antagonismus von *Dihydroergotamin* setzte eine gute Empfindlichkeit des Organs gegen Adrenalin, sowie eine geringe Stärke des elektrischen Reizes voraus; außerdem durfte die Hemmung durch Adrenalin nicht mehr als 70% betragen. Unter diesen Bedingungen

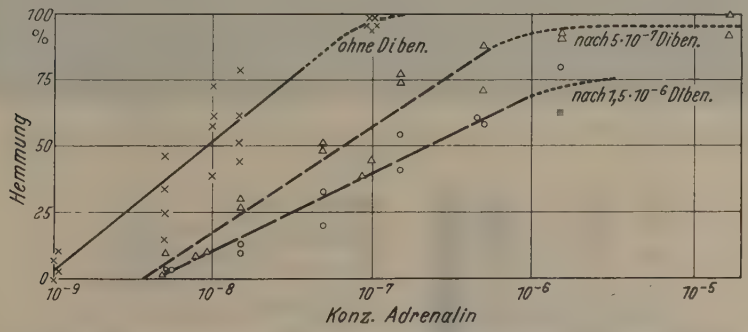


Abb. 4. Dosiswirkungskurve von Adrenalin vor und nach Einwirkung von Dibenamin am elektrisch gereizten Meerschweinchendarm. 1. × Hemmung der Darmkontraktionen durch Adrenalin (in Prozent). ——— aus den Einzelwerten zu berechnende Regressionsgerade: $Y_0 = 3{,}42 + 47{,}81 \cdot (9 + \log A)$; $B = 0{,}770$*. 2. △ Adrenalineffekte nach Vorbehandlung mit $5 \cdot 10^{-7}$ Dibenamin. - - - - - dazugehörige Regressionsgerade: $Y_1 = -21{,}70 + 38{,}38 \cdot (9 + \log A)$; $B = 0{,}879$*. 3. ○ ○ Adrenalineffekte nach Vorbehandlung mit $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ Dibenamin. ——— dazugehörige Regressionsgerade: $Y_2 = -19{,}40 + 29{,}00 \cdot (9 + \log A)$; $B = 0{,}941$*. A Adrenalinkonzentration, B Bestimmtheitsmaß nach LINDER (1957). Der gepunktete Teil der Kurven - - - - - wurde nicht berechnet, da an diesen Stellen eine Abweichung von der Linearität anzunehmen ist (Übergang der Dosiswirkungskurve zur Horizontale). * $P < 0{,}001$

gelang es in einigen Versuchen, eine Abschwächung des Adrenalineffektes exakt zu zeigen. In anderen Fällen machte eine depressive Eigenwirkung eine direkte Beurteilung unmöglich. Durch prozentuale Umrechnung der Adrenalineffekte gegenüber der jeweils veränderten Ausgangslage konnte man jedoch auch hier zu positiven Ergebnissen gelangen. Für eine antagonistische Wirkung schien ein Dosenverhältnis von 1 : 0,5 bzw. eine absolute Dihydroergotamin-Konzentration von 10^{-9} g/ml am günstigsten. Soweit eine Eigenwirkung zustandekam, trat sie sofort auf und hielt länger an; die Aufhebung der Adrenalinwirkung setzte dagegen etwas später ein und war von kürzerer Dauer. Für das Auftreten der Eigenwirkung ist keine genaue Grenzkonzentration anzugeben. Sie lag zwischen 10^{-7} und $5 \cdot 10^{-9}$ g/ml.

3. Durch eine Vorbehandlung mit *Regitin* ließ sich der Adrenalineffekt hemmen oder völlig blockieren. Die Wirkung hielt relativ lange an.

Häufig war der Ausgangszustand auch nach mehrmaligem Auswaschen nicht mehr zu erreichen. Bei einem Dosenverhältnis von 1:1 und einer Konzentration von 10^{-8} g/ml war der Antagonismus zu Adrenalin optimal. Eine Kontraktionshemmung durch Papaverin blieb unbeeinflußt (Abb. 5).

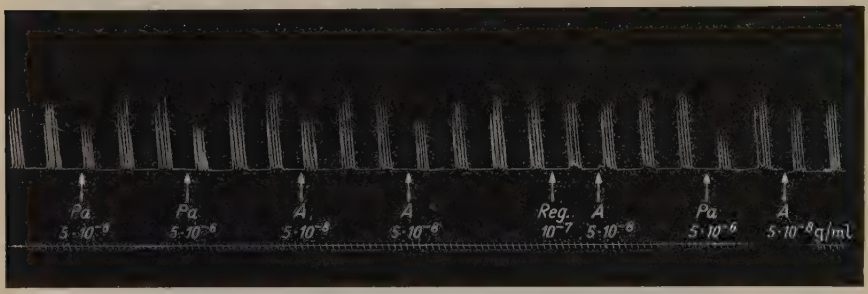


Abb. 5. Die antagonistische Wirkung von Regitin gegen Adrenalin im Vergleich zu Papaverin. *Pa* Papaverin hydrochl.; *A* Adrenalin; *Reg* Regitin. Weitere Erklärungen siehe Legende zu Abb. 2

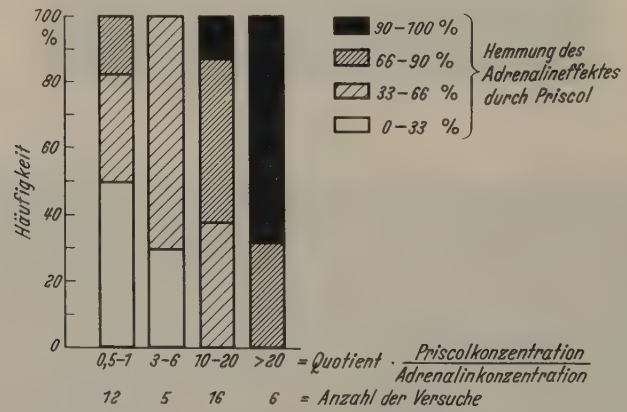


Abb. 6. Der Priscol-Adrenalinantagonismus am elektrisch gereizten Meerschweinchenileum. Ordinate = Prozentuale Verteilung der in Klassen zusammengefaßten Versuchsergebnisse

4. Der größte Teil der Experimente wurde mit *Priscol* durchgeführt, dessen Wirkung im Gegensatz zu den drei anderen Substanzen besser auswaschbar war. Bei geeigneter Dosierung ließ sich in allen Fällen eine 40—90%ige Adrenalin- oder Noradrenalinhemmung deutlich abschwächen oder völlig aufheben. Abb. 6 zeigt, daß mit Zunahme der relativen Priscoldosis der Antagonismus stärker wird.

Die Korrelation wird schlechter, wenn man die absoluten Priscolkonzentrationen zur antagonistischen Wirksamkeit in Beziehung setzt: Für Konzentrationen von 10^{-8}—10^{-6} g/ml fanden sich alle Grade einer Hemmung, wobei im Durchschnitt die stärker blockierenden Wirkungen in den Gruppen mit höheren Konzentrationen beobachtet wurden.

Priscol hatte in der angewendeten Dosis keine Eigenwirkung. Erst höhere Konzentrationen als 10^{-6} g/ml führten zu einer Abschwächung der Reizantworten oder zu einem Tonusanstieg.

Für den Antagonismus Adrenalin-Priscol führten wir außerdem 13mal je 2 Einzelbestimmungen an den Darmstücken von 5 Tieren durch und erhielten folgende pA_2-Werte: 6,49; 7,13; 7,17; 6,21; 7,33; 7,60; 7,76; 7,81; 8,00; 7,83; 7,95; 8,00; 7,70. Der Mittelwert betrug demnach 7,46 mit einem mittleren Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ von $\pm$ 0,159. Der Mittelwert änderte sich nur unwesentlich, wenn er nicht aus den Einzelwerten direkt berechnet wurde, sondern aus den Teilmittelwerten, die sich für die einzelnen Tiere ergaben. Er betrug dann 7,424 $\pm$ 0,107.

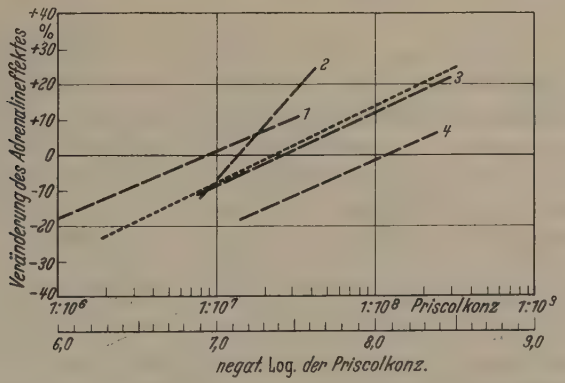


Abb. 7. Bestimmung des pA_2 von Priscol gegen Adrenalin am elektrisch gereizten Meerschweinchenileum durch Regressionsgleichungen. Die Werte der Veränderungen an verschiedenen Darmstücken des gleichen Tieres sind zu je einer Regressionsgeraden — — — zusammengefaßt. - - - - - gemeinsamer Regressionskoeffizient b 21,63 ($P < 0{,}001$). — Die 4 einzelnen Regressionsgleichungen sind:

$Y_1 = -18{,}41 + 19{,}02\ (\log X - 6{,}0)\ B = 0{,}80;\ (P < 0{,}001)$	$pA_2 = 6{,}968$
$Y_2 = -\ 7{,}65 + 49{,}18\ (\log X - 7{,}0)\ B = 0{,}48;\ (P < 0{,}05)$	$pA_2 = 7{,}156$
$Y_3 = -\ 9{,}46 + 21{,}06\ (\log X - 7{,}0)\ B = 0{,}34;\ (P < 0{,}05)$	$pA_2 = 7{,}449$
$Y_4 = -21{,}63 + 19{,}36\ (\log X - 7{,}0)\ B = 0{,}08;\ (P > 0{,}05)$	$pA_2 = 8{,}118$
Mittelwert der	$pA_2 = 7{,}422$

Die Regressionskoeffizienten sämtlicher Gleichungen sind *nicht* signifikant voneinander unterschieden; dagegen ist der Abstand zwischen den einzelnen Regressionen überzufällig ($P < 0{,}001$)

Wir haben unsere Versuche zusätzlich einer umfassenden statistischen Analyse unterzogen, um die Tiervariabilität mit der eigentlichen methodischen Streuung vergleichen zu können. In diese Berechnung wurde das gesamte Beobachtungsmaterial einbezogen, soweit es für die Bestimmung eines pA_2 geeignet war.

Aus insgesamt 46 Werten an 22 Darmstücken von 4 Tieren ließ sich für die Wirkungen, die an Präparaten des gleichen Tieres erhalten wurden, je eine (im halblogarithmischen Maßstab geradlinige) Regression bestimmen (Abb. 7). Eine von diesen war für sich allein statistisch nicht zu sichern. Da aber der Regressionskoeffizient mit den anderen übereinstimmt, darf auch hier eine Signifikanz bei größerer Versuchszahl erwartet werden.

Mit Kovarianzanalyse konnte gezeigt werden, daß die stärkere Abweichung von der Parallelität bei einer der Regressionen zufällig ist. Die zu erwartende Einheitlichkeit des Anstiegs der Dosis-Wirkungskurven ist demnach am elektrisch gereizten Darm gegeben. Andererseits fand sich ein signifikanter Unterschied für die Abstände der einzelnen Regressionen ($P < 0{,}001$); d. h. die zur gleichen sympatholytischen Wirkung notwendigen Konzentrationen sind bei den einzelnen Tieren deutlich verschieden. Ein Vergleich des Mittelwertes der zu jeder Regression gehörenden pA_2 mit dem nach dem einfachen Verfahren bestimmten Mittelwert der pA_2 (Abb. 1) zeigt nur einen geringfügigen Unterschied zwischen beiden: 7,422 gegen 7,424 (unter Verwendung der Mittelwerte je Tier) bzw. 7,460 (wenn alle Werte das gleiche Gewicht bekommen).

Für den Antagonismus von Priscol gegen Noradrenalin wurden weniger Versuche durchgeführt (10 Versuche an 6 Organstücken eines Tieres). Wir kamen hier zu ähnlichen Ergebnissen wie für Adrenalin. Die einzelnen pA_2, nach der einfachen Methode gemessen, betrugen 6,75; 7,00; 6,69; 7,01 mit einem Mittelwert von $6{,}866 \pm 0{,}081$. Mittels der Regressionsgleichung bestimmt, ist er nur wenig verschieden, nämlich: 6,90. Der Regressionskoeffizient war ebenfalls signifikant ($P < 0{,}05$).

Es ergab sich ein etwas niedrigerer pA_2 für den Antagonismus gegen Noradrenalin als für den gegen Adrenalin. Der Unterschied war bei der geringen Anzahl der Noradrenalinversuche nicht zu sichern ($P > 0{,}05$). Aus der fehlenden Signifikanz des Unterschiedes läßt sich kein endgültiger Schluß auf die evtl. verschiedene antagonistische Beeinflußbarkeit beider Brenzkatechinamine ziehen.

Besprechung der Ergebnisse

Wir möchten in Übereinstimmung mit Gross, Tripod u. Meier (1951) einen *spezifischen* Antagonismus zwischen zwei Substanzen dann annehmen, wenn 1. die antagonistische Wirkung mit Konzentrationen zu zeigen ist, bei denen der Antagonist noch keine Eigenwirkung besitzt und 2. eine antagonistische Wirkung gegen andere Substanzen, die dem Agonisten wirkungsähnlich sind, nicht vorhanden ist. Bei der in unseren Versuchen dargestellten Beeinflussung eines inhibitorischen Adrenalineffektes durch die 4 Sympatholytica handelt es sich demnach um einen *spezifischen* Antagonismus.

Für die Wirkung der Mutterkornalkaloide haben bereits Rothlin, Konzett, Cerletti (1954) den gleichen Schluß gezogen, ebenso Müller (1945) für Priscol und Gross, Tripod u. Meier (1951) für Regitin. Andererseits vertrat Nickerson (1949) die Auffassung, daß ein spezifischer Antagonismus der Sympatholytica gegen inhibitorische Adrenalinwirkungen unter anderem deswegen als unwahrscheinlich abgelehnt werden müsse, weil mit dem als besonders spezifisch geltenden Sympatholyticum Dibenamin keine antagonistische Wirkung erzielt werden konnte. Sein Argument schien besonders stichhaltig zu sein, nachdem mit diesem

Pharmakon auch in neueren Arbeiten am isolierten Kaninchendarm (Agarwall u. Harvey 1955), am isolierten Rattenuterus (Holzbauer u. Vogt 1956) und an der Bronchialmuskulatur (Schaepdrijver 1948) keine spezifische Hemmwirkung gefunden wurde.

Mit unserer Methode gelang es somit zum erstenmal, mit Dibenamin einen inhibitorischen Adrenalineffekt spezifisch zu beeinflussen. Die oben genannten Kriterien eines spezifischen Antagonismus waren dabei erfüllt, da Dibenamin in der angewendeten Konzentration keine Eigenwirkungen aufwies und da der hemmende Effekt von Papaverin unverändert blieb. Auch eine unspezifische Wirkung über eine Stimulierung der Acetylcholinfreisetzung (Paton 1955; 1956) oder eine Hemmung der Cholinesterase war auszuschließen, da sich sonst bei submaximaler Reizung eine Verstärkung der Kontraktionen hätte ergeben müssen, wie sie z. B. bei dem Cholinesterasehemmstoff Prostigmin zu beobachten war (Härtfelder, Kuschinsky u. Mosler 1958). Falls überhaupt eine Eigenwirkung auftrat — nur in hohen Konzentrationen —, so bestand sie in einer Verminderung der Kontraktionshöhe.

Durch die antagonistische Wirkung von Dibenamin wird die Dosiswirkungskurve von Adrenalin nicht nur in Richtung der höheren Dosis verschoben, sondern ihr Verlauf wird mit zunehmender Dibenaminkonzentration flacher und selbst mit größten Adrenalingaben wird keine 100%ige Hemmung mehr erreicht. Es ist daher zu folgern, daß mindestens bei einem Teil der Receptoren eine bleibende Veränderung stattgefunden hat und kein kompetitiver Antagonismus vorliegt (Maanen 1950; Timms 1956).

Die Annahme ist berechtigt, daß — im Gegensatz zu dem Antagonismus der Sympatholytica gegen Adrenalin — die Wirkung von Adrenalin selbst über einen funktionellen Antagonismus gegen die elektrisch ausgelösten Kontraktionen erfolgt. Es ist dabei ohne Bedeutung, ob die Kontraktionen als Folge einer Freisetzung von Acetylcholin (Paton 1956) oder einer direkten Reizung der Muskelfasern durch den elektrischen Strom hervorgerufen werden. Mit der Vorstellung eines funktionellen Antagonismus läßt sich vereinbaren, daß das Ausmaß des muskelerschlaffenden Effektes von Adrenalin von der Stärke der (entgegengesetzt wirkenden) elektrischen Impulse abhängig ist.

Für die Prüfung adrenergisch blockierender Substanzen am Darm bedeutet es einen wesentlichen Vorteil, daß bei submaximaler elektrischer Reizung die Empfindlichkeit des Meerschweinchendarmes etwa eine Zehnerpotenz höher liegt als die des spontan arbeitenden isolierten Kaninchendarmes, der bisher in erster Linie zur Bearbeitung dieser Fragestellung herangezogen worden ist. Die Prüfung der adrenolytischen Wirkung von Dihydroergotamin zeigt jedoch, daß dieser Vorteil allein nicht immer genügt, um zu eindeutigen Ergebnissen zu gelangen. Es

müssen verschiedene Bedingungen eingehalten werden, um mit so geringen Konzentrationen auszukommen, daß Eigenwirkungen nicht auftreten und somit der Antagonismus als spezifisch erkannt werden kann. Die Schwierigkeit, mit Dihydroergotamin den Antagonismus deutlich zu machen, zeigt auffällig, wie sich die konventionellen Methoden und die der elektrischen Reizung gegenseitig ergänzen können, da gerade mit Mutterkornalkaloiden von anderen Autoren eine Reihe positiver Befunde erzielt worden sind.

Wie die Bestimmung des pA_2 von Priscol gegen Adrenalin und Noradrenalin zeigt, läßt sich mit der Methode der elektrischen Reizung ein Antagonismus exakt quantitativ prüfen. Die statistische Analyse ergibt, daß zwar die Regressionskoeffizienten in allen Versuchen gleich sind, daß aber die Streuung der pA_2, die an den Darmstücken verschiedener Tiere gewonnen werden, signifikant größer ist als die Streuung der Versuchsergebnisse an *einem* Tier. Es ist daraus zu schließen, daß eine vergleichende Prüfung zweier Substanzen jeweils in Parallelversuchen am Darm *eines* Tieres durchgeführt werden sollte. Da dieses Ergebnis erst nach Auswertung des gesamten Beobachtungsmaterials gewonnen wurde, sind die für die statistische Berechnung günstigeren Bedingungen in den vorliegenden Versuchen noch nicht eingehalten worden.

Summary

Adrenaline and noradrenaline were found to depress the contractions of the electrically stimulated isolated ileum of the guinea-pig; this action was related to the dose. In these experiments smaller amounts of adrenaline were required than those necessary for the depression of the spontaneous movements of the isolated rabbit duodenum.

Dibenamine, dihydroergotamine, regitin and priscol were found to antagonize specifically the inhibitory action of adrenaline and noradrenaline and this antagonism was related to the dose. Papaverine had an action similar to that of adrenaline, but it was not antagonized by the sympatholytic substances. Antagonistically active concentrations of dibenamine, regitin and priscol had no actions of their own; the antagonistic action of dibenamine was irreversible. As relatively low concentrations of dihydroergotamine had a depressing action on the intestine, the adrenaline antagonism of this substance was obtained only under optimal conditions.

Using Schilds method (pA_2) the priscol-adrenaline and -nor-adrenaline antagonism has been estimated quantitatively. Statistical analysis showed that the pA_2- values differed significantly between animals but not between preparations from one animal.

Literatur

Agarwal, S. L., and St. Harvey: Failure of dibenamine to block adrenergic inhibitory responses. Arch. int. Pharmacodyn. **101**, 476 (1955).

Dale, H. H.: On some physiological actions of ergot. J. Physiol. (Lond.) **34**, 163 (1906).

Gross, F., J. Tripod u. R. Meier: Regitin (Präparat C 7337), ein neues Imidazolinderivat mit spezifischer sympathikolytischer Wirkung. Schweiz. med. Wschr. **1951**, 352.

Härtfelder, G., G. Kuschinsky u. K. H. Mosler: Über pharmakologische Wirkungen an elektrisch gereizten glatten Muskeln. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 66 (1958).

Holzbauer, M., and M. Vogt: Modification by drugs of the response of the rat's uterus to adrenaline. Brit. J. Pharmacol. **10**, 186 (1955).

Linder, A.: Statistische Methoden. 2. Aufl. Basel: Birkhäuser 1957.

Maanen, E. F. van: The antagonism between acetylcholine and the curare alcaloids, d-tubocurarine, c-curarine-I, c-toxiferine-II and β-erythroidine in the rectus abdominis of the frog. J. Pharmacol. exp. Ther. **99**, 255 (1950).

Müller, R.: Vergleichende Pharmakologie des Priscol. Schweiz. med. Wschr. **1945**, 29.

Nickerson, M.: The pharmacology of adrenergic blockade. Pharmacol. Rev. **1**, 27 (1949).

Nickerson, M., and L. S. Goodman: Pharmacological properties of a new adrenergic blocking agent: N,N-dibenzyl-β-chlorethylamine (dibenamine). J. Pharmacol. exp. Ther. **89**, 167 (1947).

Paton, W. D. M.: The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. J. Physiol. (Lond.) **127**, 40P (1955).

Paton, W. D. M.: The responses of, and release of acetylcholine by guinea-pig small intestine in response to coaxial electrical stimulation. Abstr. of International Physiol. Congress (Bruxelles) XX, 708 (1956).

Planelles, J.: Mutterkornstudien. I. Über das Zusammenwirken von Ergotamin und Adrenalin am Meerschweinchendarm. Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **105**, 38 (1925).

Rothlin, E.: Über die pharmakologische und therapeutische Wirkung des Ergotamin auf den Sympathikus. Klin. Wschr. **1925**, 1437.

Rothlin, E.: The spezific action of the ergot alcaloids on the sympathetic nervous system. J. Pharmacol. exp. Ther. **36**, 657 (1929).

Rothlin, E., H. Konzett and A. Cerletti: The antagonism of ergot alcaloids towards the inhibitory response of the isolated rabbit intestine to epinephrine and norepinephrine. J. Pharmacol. exp. Ther. **112**, 185 (1954).

Schaepdrijver, A. de: Actions pharmacologiques sur le muscle bronchique des poumons isolés du cobaye normal et anaphylactise. Arch. int. Pharmacodyn. **77**, 46 (1948).

Schild, H. O.: pA, a new scale for measurement of drug antagonism. Brit. J. Pharmacol. **2**, 189 (1947).

Timms, A. R.: The mode of action of some nonspecific acetylcholine antagonists. Brit. J. Pharmacol. **11**, 273 (1956).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 102—119 (1958)

Aus den Forschungslaboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Ursächliche Bedingungen der durch Polysaccharide ausgelösten Leukocytenemigrationsförderung und chemotaktischen Reaktion in Gewebekulturen

Von
R. Meier und B. Schär

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Februar 1958)

Bei unseren Untersuchungen über die leukocytenemigrationsfördernde Wirkung von Bakterienpolysacchariden aus Proteus vulgaris OX 19[6,7,9,10] wurden wir zu der Auffassung geführt, daß die in der gewebezüchterischen Anordnung beobachtete chemotaktische Reaktion und die Emigrationsförderung miteinander in Beziehung stehende Phänomene sind. Die „Chemotaxis", d. h. die exzentrisch gerichtete Auswanderung mit Anhäufung der Leukocyten ist die Reaktion, die bei Auswanderung aus einem etwa 2×2 mm großen, in Plasma angesetztem Stück des „buffy coat" erfolgt, wenn wirksame Produkte in gewisser Distanz vom Stück angebracht werden. Allgemeine Emigrationsförderung erfolgt dann, wenn wirksame Stoffe dem Plasmagerinnsel in gelöster Form beigemischt werden. Das Auftreten beider Phänomene bei wirksamen Substanzgruppen in stets gleichbleibender Konzentrationsrelation legte den Gedanken nahe, daß beiden Reaktionen ein gleicher Mechanismus zugrunde liegt.

Die „Chemotaxis" kann als exzentrische Auswanderungsförderung aufgefaßt werden. Ist dies richtig, so müßte man zwischen zwei Möglichkeiten chemotaktischer Reaktion unterscheiden:

1. Diejenige, die dadurch zustande kommt, daß die aus dem Explantat in den zellfreien Nährboden austretenden Zellen bevorzugt und vermehrt in eine bestimmte, d. h. auf das wirksame Objekt zugekehrte Richtung gelenkt werden, ohne daß dabei die Geschwindigkeit und Art der Wanderung geändert wird.

2. Die Form, die durch beschleunigte, verlängerte oder vermehrte Wanderung der Leukocyten in einer schon determinierten Richtung zustande kommt, so daß in der Zeiteinheit „mehr" Zellen auf das wirksame Objekt zuwandern, ohne daß dabei die Richtung geändert würde.

Beides sind offenbar verschieden geartete Phänomene, die zu gleichem Resultat, der exzentrischen Anhäufung von Zellen führen können. Dabei

ist nicht ausgeschlossen, daß bei der Anhäufung der Zellen noch andere Faktoren eine Rolle spielen, z. B. Begrenzung von Dauer oder Strecke der Wanderung, Beeinträchtigung der Leukocyten durch hohe Konzentrationen des Agens in der Nähe desselben usw. Diese Möglichkeiten werden vorläufig nicht diskutiert werden, da die Entscheidung zwischen den beiden differenten Typen der chemotaktischen Reaktion zunächst getroffen werden muß, bevor Erörterung weiterer Fragen möglich ist.

Die Feststellung der Richtungsänderung wandernder Leukocyten ist am besten durch die mikroskopische Beobachtung einzelner Leukocyten möglich. Richtungsänderung einzelner wandernder Leukocyten beschreiben u. a. COMANDON[3], MCCUTCHEON[5] und HARRIS[4]. Das meist mit lebenden Keimen erzielte Phänomen wird nur innerhalb von sehr geringen Distanzen manifest (etwa 0,2 mm). Unter den von uns benutzten Versuchsbedingungen ist die noch zu „Chemotaxis" führende Distanz zwischen Leukocyten und Bakterien oder Bakteriensubstanz etwa 20mal größer und fällt damit in einen Bereich, in dem an einzeln wandernden Leukocyten bisher keine Richtungsabweichung beobachtet wurde. Das Verhalten von Einzelleukocyten, die sich aus einem Blutropfen auf das Deckglas absetzen, ist verschieden von dem der zentrifugierten Blutleukocyten, die in gewebezüchterischer Anordnung auswandern. Einzelleukocyten wandern einen zufälligen Weg, ändern ständig die Richtung und Geschwindigkeit ihrer Bewegung und behalten ihre Beweglichkeit nach Angaben von HARRIS und nach eigenen Versuchen über 20—30 Std bei. Zentrifugierte Blutleukocyten wandern gerichtet vom Explantat in den zellfreien Nährboden. Ihre Ausbreitung ist gleichmäßig, zeigt ein Optimum in der 4.—6. Std und ist nach etwa 18 Std beendet.

Bei der gewebezüchterischen Methode ist die Beobachtung einzelner Leukocyten besonders über lange Strecken schwierig, wenn nicht undurchführbar. Änderungen der Versuchsbedingungen, Benutzung von flachen Kammern mit dadurch flachem Plasmagerinnsel oder Serumnährmedien, die eine solche Beobachtung ermöglichen, bedeutet eine Reihe von Abweichungen der Versuchsbedingungen, deren Einfluß schwer zu übersehen ist.

Wir haben deshalb versucht, durch Variation bestimmter Versuchsbedingungen, besonders in der Anordnung der Leukocyten, den Charakter und die Ursache der Auswanderungswirkung von Polysacchariden mit der gewebezüchterischen Methode genauer festzustellen.

Methode

Leukocytenauswanderung. Das Blut von Hühnern wird ohne Zusatz von Antikoagulantien in silikonisierte Zentrifugengläser ⌀ 30 mm aufgefangen. Nach Abhebern des Plasmas vom zentrifugierten Vollblut wird durch Auftropfen von geringen Mengen Embryonalextrakt die Leukocytenhaut zum Gerinnen gebracht.

Durch Waschen in Tyrode wird das Gerinsel von anhaftenden Erythrocyten befreit. Mit dem Starmesser können nun Stücke von gewünschter Größe ausgeschnitten werden. Diese werden in einen Nährboden von 1,25 cm^3 Hühnerembryonenextrakt (EE_{10}) und 1,25 cm^3 Hühnerplasma eingebettet. Zur Erzielung guter Resultate ist es wichtig, daß die Kulturschalen einen genauen Durchmesser und einen absolut planen Boden besitzen, da die Auswanderungsgröße abhängig ist von der Dicke des Nährbodens. Das Auswanderungsareal wird in mehreren Zeitintervallen planimetriert.

Material

Das zu den vorliegenden Untersuchungen verwendete Bakterienpolysaccharid ist ein Lipopolysaccharid und wurde von Dr. F. W. Kahnt in unseren chemischen Laboratorien aus dem Kulturmedium von Proteus vulgaris OX 19 isoliert (PPS).

Filtrierpapier wurde 3mal mit H_2O dest. ausgekocht, getrocknet, sterilisiert und vor dem Gebrauch mit PPS-Lösung getränkt.

Ergebnisse

1. Abhängigkeit der Reaktion der Leukocyten von der Größe des buffy coat Stückes

a) Normale Auswanderung. Zunächst wird untersucht, welchen Einfluß die Größe der explantierten buffy coat Stückchen auf die Emigration und die chemotaktische Reaktion ausübt.

Es ist bekannt, daß Leukocyten des gleichen Tieres bei Verwendung der gleichen Kulturmedien in gleicher Schichthöhe und bei gleich großen Leukocytenexplantaten identische Auswanderungsareale bilden. Sehr gut wandernde Leukocyten aus Explantaten von etwa 2 mm Kantenlänge bilden ein schön kreisrundes Areal, schlechter wandernde ein an den Ecken abgerundetes Quadrat. Es wurde beobachtet, daß dickere Leukocytenschichten schlechter wandern, weniger dicke besser.

Ansetzen verschieden großer Stücke ergibt bei kleineren Explantaten ein kreisrundes, bei größeren ein mehr quadratisches Auswanderungsareal. Die Breite der Auswanderungszone ist bei mittleren Explantatgrößen etwa gleich. Bei sehr großen Explantaten wird sie unregelmäßig, da die Leukocyten an den vier Ecken etwas stärker wandern als an den Kanten (Abb. 1). Werden die Stücke größer als etwa 5 mm geschnitten, so kann es zu einer ausgeprägten Auswanderungshemmung an den Kanten des Explantates kommen.

Ist das Explantat kleiner als 0,5 mm Kantenlänge, so wird die Auswanderung unregelmäßig verringert. Es nähert sich offenbar dann die Emigration der Wanderung diffus verteilter Leukocyten, eventuell auch derjenigen einzelner Leukocyten. Dies weist darauf hin, daß die absolute Menge oder die in der Raumeinheit vorhandene Leukocytenkonzentration für den Umfang der Auswanderung mitverantwortlich ist. In diesem Falle können die „Kollision der Leukocyten" bzw. die von den Zellen produzierten oder abgebauten Stoffe einen wichtigen Faktor darstellen.

Diese Befunde zeigen, daß die Größe des buffy coat Stückchens einen determinierenden Einfluß auf die Emigration hat. Nur innerhalb einer beschränkten Variation der Explantatgrößen erfolgt eine optimale Auswanderung. Diese Tatsache ist für die weitere Analyse zu berücksichtigen.

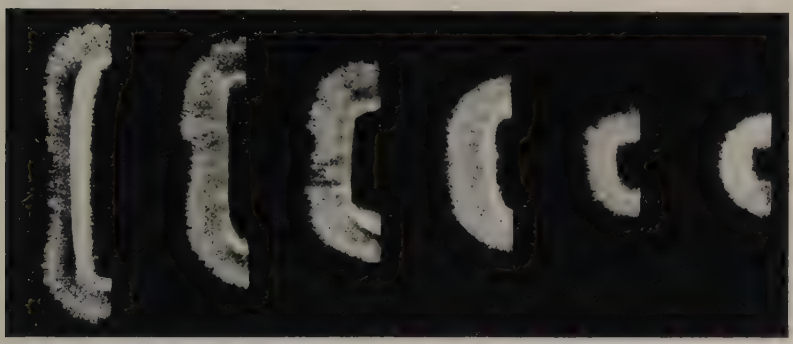


Abb. 1. Unbeeinflußte Auswanderung von Leukocyten aus buffy coat Stücken verschiedener Kantenlänge: von oben nach unten etwa 5×5, 4×4, 3×3, 2×2, 1×1, $0{,}5 \times 0{,}5$ mm

b) Wirkung von PPS auf die Emigration. Die nächste Frage ist, ob der Zusatz von optimalen PPS-Konzentrationen zu Plasma bei verschieden großen buffy coat Stückchen den gleichen oder einen verschiedenen Einfluß besitzt. Wird bei einem Versuch mit einer PPS-Konzentration von 10^{-8} der Abstand von der Kante des Explantates bis zum Rand der Auswanderungszone bei Versuchs- und Kontrollkulturen gemessen, so ergeben sich folgende Durchschnittswerte (Tab. 1).

Tabelle 1

ungefähre Kantenlänge des Explantates mm	Auswanderungsweg	
	bei Kontroll-Kulturen mm	bei Versuchs-Kulturen mm
5	1,16	2,23
4	1,20	2,07
3	1,25	2,20
2	1,26	2,00
1	0,92	1,50
0,5	0,90	0,9—1,20
<0,5	0,50	0,5—0,70

Für die Bestimmung der Auswanderungsgröße ist die Breite der Auswanderungszone in zirkulärer Richtung als geeignetes und zweckmäßiges Maß anzusehen. Der Wert läßt sich wegen der quadratischen Struktur des angesetzten Stükkes nicht absolut genau bestimmen, doch genügt die Genauigkeit, um gewisse Schlußfolgerungen zu ziehen. Die in der Tab. 1 angegebenen Werte zeigen eindeutig, daß die Breite der Auswanderungszone bei kleinen Stücken klein ist, daß sie bei 2 mm Kantenlänge etwa den Maximalwert erreicht, der mit einem flachen Maximum von 2 mm² bis zu 4 mm² beibehalten wird; bei noch größeren Stücken ist der Wert eher wieder etwas

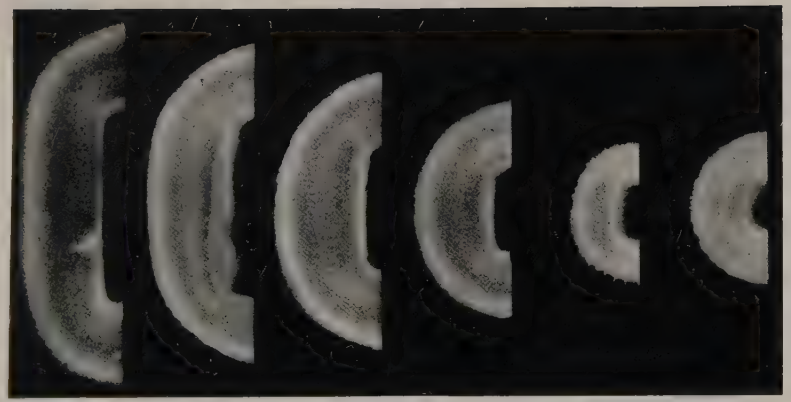


Abb. 2

Abb. 2. Durch PPS 10^{-5} geförderte Auswanderung von Leukocyten aus buffy coat Stücken verschiedener Kanten, länge: von oben nach unten etwa 5×5, 4×4, 3×3, 2×2 1×1, $0{,}5\times0{,}5$ mm

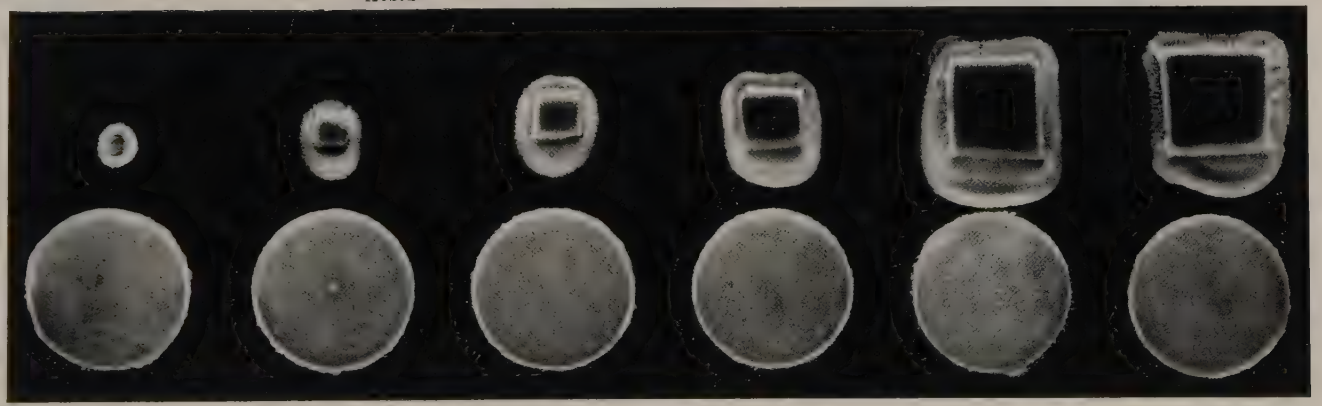


Abb. 3 a

Abb. 3a. „Chemotaktische" Reaktion von Leukocyten aus buffy coat Stückchen mit verschiedener Kantenlänge. Konzentration des PPS 10^{-6} in runden Filtrierpapierchen bei gleich großem Abstand zur Leukocytenkultur

kleiner (Abb. 2). Die Photographien und die Zahlenwerte belegen dieses Ergebnis.

Die Wirkung der Polysaccharide bei Zusatz zum Medium geht im Prinzip mit der primären Auswanderungsstärke parallel, d. h. es ist fast keine Wirkung bei kleinen Stücken und größte Wirkung bei den optimal auswandernden Stücken vorhanden. Es geht aus diesen Befunden somit

Abb. 3b. Positive und fehlende „chemotaktische" Reaktion von großen resp. kleinsten Explantaten gegenüber einer im runden Filtrierpapier aufgelegten PPS-Konzentration 10^{-6}

hervor, daß für die emigrationsfördernde Wirkung der PPS besondere Vorbedingungen notwendig sind, die mit der Masse des Stückes in Zusammenhang stehen. Die Menge der auswandernden Leukocyten ist bei großen Stücken wahrscheinlich größer als bei kleinen, je mehr Leukocyten im angesetzten Stück vorhanden sind, desto mehr wandern offenbar aus.

c) Wirkung von PPS auf Chemotaxis. Um konstante Verhältnisse zu erzielen, wird die „chemotaktische" Reaktion durch gleich große und mit gleich konzentrierten PPS-Lösungen (10^{-6}) imprägnierte Filterpapierstücke, die in gleichem Abstand vom Rande des buffy coat Stückchens

angebracht werden, ausgelöst (Abb. 3a). Das Ergebnis der Versuche ist weitgehend analog dem unter b) geschilderten Verhalten. Die bei der „chemotaktischen" Reaktion zurückgelegte Strecke der Leukocyten ist bei den Explantaten mit optimaler Emigrationsgröße annähernd gleich. Allerdings scheint die Menge der an der chemotaktischen Reaktion beteiligten Leukocyten entsprechend der größeren Menge vorhandener Leukocyten bei den größeren Explantaten erhöht.

Ist das Stückchen des buffy coat kleiner als dasjenige, welches optimale Emigration ergibt, so ist nur eine geringe, in gewissen Fällen keine chemotaktische Reaktion zu beobachten (Abb. 3b). Dieser Befund ist bemerkenswert und steht offenbar mit der fehlenden emigrationsfördernden Wirkung unter analogen Bedingungen in Zusammenhang. Seine Ursache wird zu diskutieren sein.

2. Auswanderungsreaktionen bei „diffuser" Verteilung der Leukocyten

Aus den vorstehend geschilderten Versuchen geht bereits hervor, daß die Menge der Leukocyten bzw. die Größe des buffy coat Stückes einen ausgesprochenen Einfluß auf die Reaktion der Leukocyten besitzt. Die Gründe für ein solches Verhalten können verschiedene sein.

Um sicher zu sein, daß im wesentlichen die Menge der Leukocyten der entscheidende Faktor ist, muß gezeigt werden, daß einerseits kleine, zu einem großen zusammengesetzten Stück wieder die Reaktionsform der nicht unterteilten großen Stücke besitzen und daß andererseits die diffuse Verteilung der Stücke im Plasma einen Einfluß nur in Abhängigkeit von der Explantatgröße besitzt.

Die Beantwortung der ersten Frage ergibt sich aus den nachstehenden Befunden.

Es wurden Leukocytenexplantate von 3 mm Kantenlänge 1. derart unterteilt, daß 9 kleine Explantate entstanden, 2. in zahlreiche kleine Stücke zerschnitten. Die Teilstückchen wurden nach Möglichkeit wieder zusammengesetzt und ihre Reaktion mit derjenigen des Stückes in Originalgröße und des kleinen Teilstückes verglichen. Der Auswanderungshof kleinster Explantate unter normalen Bedingungen und unter PPS ist kleiner als derjenige der zusammengesetzten und ganzen größeren Explantate. Die aus suboptimalen Stücken zusammengesetzten optimalen zeigen unter Einwirkung von PPS die gleiche Emigrationsförderung wie die nicht unterteilten gleicher Größe.

Die Größe der „chemotaktischen" Reaktion ist ebenfalls von der Masse der explantierten Leukocyten abhängig. Nur bei zusammengesetzten Stückchen entspricht die Chemotaxis derjenigen der nicht geteilten Stücke. Wird die Emigration durch Zusatz von PPS 10^{-8} in den Nährboden gesteigert, so läßt sich durch exzentrisches Aufbringen einer PPS-Konzentration von 10^{-6} keine weitere Emigrationssteigerung mehr hervorbringen.

Um die zweite Frage zu bearbeiten, läßt sich eine Verteilung der Leukocyten im Plasmagerinnsel auf verschiedene Weise vornehmen. Es kann mit einer Leukocytenemulsion gearbeitet werden, die in Embryonalextrakt suspendiert dem Plasma zugesetzt wird oder man kann aus dem buffy coat kleinste Leukocyten enthaltende Stücke herstellen und diese im Plasma vor der Gerinnung verteilen. Die letzte Anordnung hat den Vorteil, daß bei ihr die buffy coat Leukocyten verwendet werden können. Um alle möglichen Unterschiede der Versuchsanordnung auszuschalten, wurde so vorgegangen, daß in der gleichen „Kulturschale" sowohl die üblichen buffy coat Stückchen wie die diffus verteilten Leukocyten angesetzt wurden. Das PPS wurde wie üblich im Filterpapier aufgebracht. Das Ergebnis dieser Versuche ist eindeutig. Die aus den üblichen buffy coat Stückchen zirkulär auswandernden Leukocyten zeigen gegenüber PPS imprägnierten Filterpapierstückchen die stets beobachtete „chemotaktische" Reaktion, während die diffus im Gemisch verteilten Leukocyten auch bei gleichem Abstand von den PPS oder Bakterien keine Beeinflussung erkennen lassen.

Eine Anhäufung der diffus verteilten Leukocyten im Gebiete der Filterpapierchen oder der lebenden Proteuskulturen, wie sie bei Beeinflussung der Wanderungsrichtung zu erwarten wäre, konnte nach Ablauf von 14 Std nicht beobachtet werden.

Diese Versuche beweisen somit, daß die „Masse" der Leukocyten der entscheidende Faktor für die Größe und Art der eintretenden Reaktion ist.

3. Einfluß der Form des buffy coat Stückes auf die Wanderungsrichtung und ihre Beeinflussung durch PPS

Bei den bisher beschriebenen Versuchsvarianten mit kleineren quadratischen buffy coat Stücken ist eine „radiäre" Auswanderung der Leukocyten vorherrschend. Diese erschwert die Beurteilung einer Richtungsänderung bei der „chemotaktischen" Reaktion. Für eine solche scheint besonders eine gerade parallele Wanderungsrichtung geeignet. Diese kann dadurch erreicht werden, daß Streifen aus dem buffy coat geschnitten und explantiert werden. Diese zeigen dann an der Längsseite eine parallele Auswanderung.

Versuche. a) Unbeeinflußte Auswanderung. An den langen Kanten weisen die buffy coat Streifen je nach der Dichte der explantierten Leukocyten eine mehr oder weniger starke Auswanderungshemmung auf. An den schmalen Kanten entspricht die Auswanderung derjenigen der 2×2 mm Explantate. *Abb. 4a* zeigt einen derartigen Leukocytenstreifen, dessen Auswanderungshof durch leichte Langkantenhemmung hantelförmig erscheint.

b) Wirkung von in Tyrode gelösten und der Kultur überschichteten PPS auf die Auswanderung. Der Zusatz von PPS ruft eine Änderung der

Emigration hervor, die im wesentlichen den vorher dargelegten Ergebnissen entspricht. Die gesamte Auswanderungszone wird vergrößert, diese ist nun an der schmalen und an der breiten Kante identisch

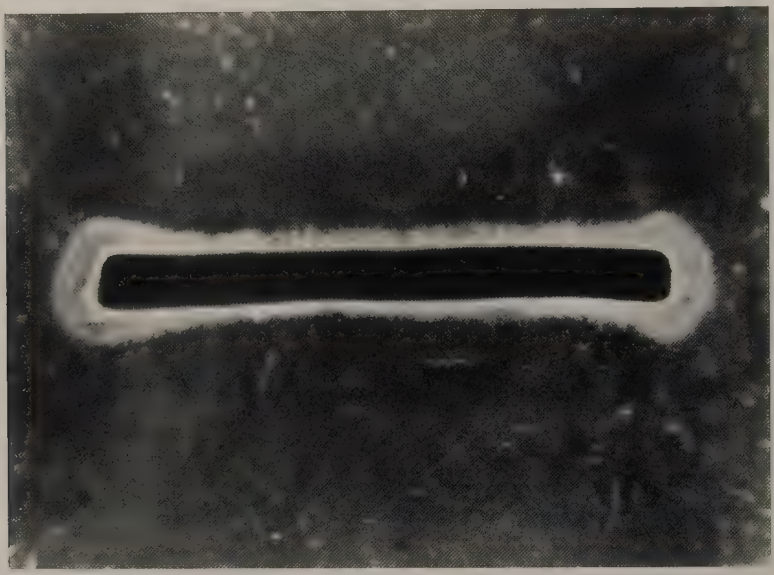


Abb. 4a. Unbeeinflußte Auswanderung von Leukocyten aus einem 2×20 mm großen buffy coat Streifen

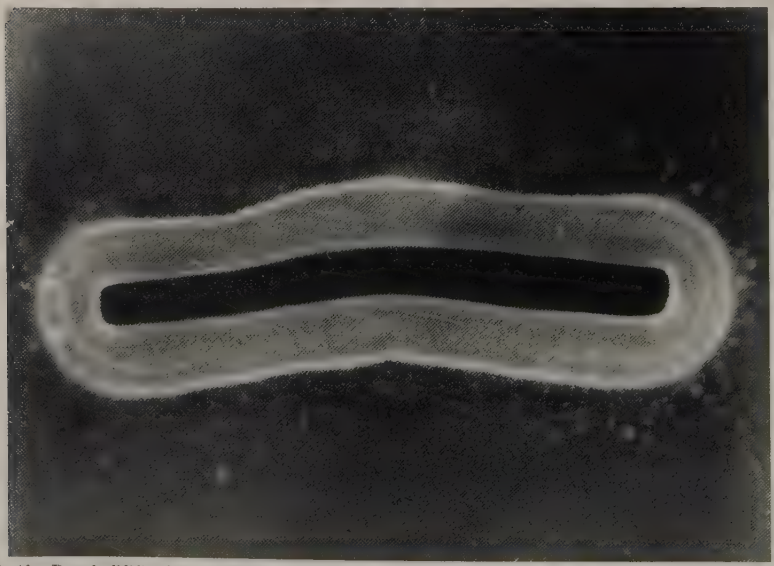


Abb. 4b. Durch PPS 10^{-8} geförderte Auswanderung von Leucocyten aus einem 2×20 mm großen buffy coat Streifen

(Abb. 4b). Bei mikroskopischer Betrachtung wird besonders die parallele Wanderung der Leukocyten an den langen Seiten eindrücklich. Bereits bei den früher dargelegten Versuchen wie auch hier ist erkenntlich, daß bei der Vergrößerung der Auswanderungszone die Zahl der ausgewanderten Leukocyten vermehrt ist.

c) Chemotaktische Reaktion. Die Chemotaxis wird in der Weise an den buffy coat Streifen geprüft, daß verschieden geformte Filterpapierstreifen in verschiedenem Abstand von der langen Kante der Streifen

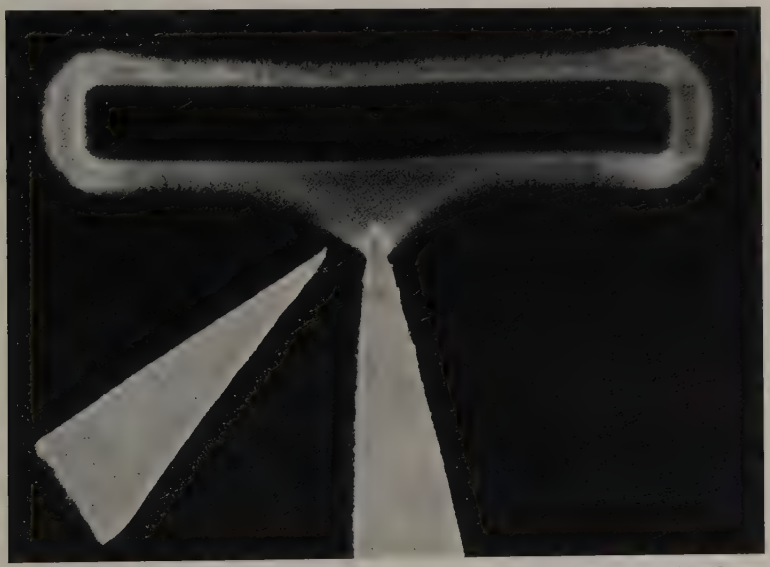


Abb. 5a. „Chemotaktische" Reaktion von Leukocyten aus einem buffy coat Streifen. Senkrechter Pfeil: Filtrierpapier getränkt in PPS 10^{-6} gelegt bei Versuchsbeginn. Schräger Pfeil: Filtrierpapierstreifen getränkt in PPS 10^{-6} 24 Std nach Versuchsbeginn

angebracht werden. Für gewisse Versuchsvarianten werden auch zwei solche Stücke gebraucht, von denen eines seine Diffusion parallel zur Auswanderung der Leukocyten, das andere senkrecht zu dieser entwickelt. Solche Versuche scheinen für die Ermittlung der Richtungsänderung von Leukocyten zweckmäßig.

Abb. 5a zeigt die eine dieser Versuchsanordnungen. Der zur breiten Kante des Explantates senkrecht liegende Pfeil ist PPS-Träger und wurde bei Versuchsbeginn neben die Kultur gelegt, der schräge Pfeil wurde mit der gleichen PPS-Konzentration getränkt und nach 24 Std bei bereits beendeter Auswanderung dem Nährboden aufgelegt. Die ausgesprochene dem senkrecht liegenden Pfeil entgegengerichtete Verbreiterung der Auswanderungszone ist deutlich. Eine zusätzliche Wanderung in der Richtung des schrägen liegenden Pfeils konnte nicht erreicht

werden. Abb. 5b läßt die in parallelen Zügen senkrecht zum Explantat erfolgte Auswanderung der Leukocyten erkennen, eine Konvergenz gegen den PPS-Pfeil läßt sich nicht beobachten.

Die Variation von Form und Lage des PPS-Trägers, wie oben beschrieben, führte in keinem Falle zu einer gegen das Objekt „abgelenkten" Wanderung, sondern nur zu einer mit der Diffusion und Konzentration variierten Auswanderungsgröße.

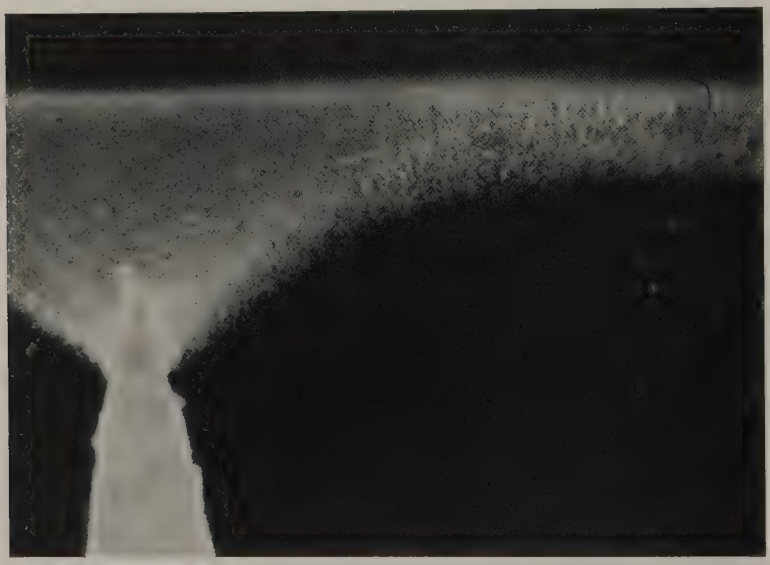


Abb. 5b. Senkrecht zum Explantatrand auswandernde Leukocyten im Gebiet der „chemotaktischen" Reaktion. Pfeil: Filtrierpapier getränkt in PPS 10^{-6}

Eine Verminderung der Auswanderung auf der dem Objekt gegenüberliegenden Seite des Explantates war nie zu erkennen, d. h. die in der Versuchsanordnung vom Objekt wegwandernden Leukocyten werden nicht auf dieses zugelenkt.

Wird das mit PPS getränkte Filtrierpapier nahe genug an den Leukocytenstreifen gebracht (Abb. 6), so ergibt sich, dem Diffusionshof entsprechend auf der Seite des Filtrierpapiers eine breite „chemotaktische" Reaktion. Auf der andern Seite ergibt sich ebenfalls eine Auswanderungsförderung mit chemotaktischer Anreicherung, aber nicht in die Richtung auf den PPS-Träger zu. Die Leukocyten wandern in dieser Versuchsanordnung auf der einen Seite gegen das, auf der andern Seite mit dem Konzentrationsgefälle. Dieses Verhalten spricht wohl eindeutig dafür, daß die Wanderungsbeschleunigung durch die Konzentration in der einmal gegebenen Richtung und nicht durch das Gefälle bestimmt wird und daß eine Zuwanderung auf die höhere PPS-Konzentration nicht erfolgt.

Da in unserer Versuchsanordnung somit eine Richtungsänderung der wandernden Leukocyten unter Einfluß von PPS nicht nachweisbar ist, muß angenommen werden, daß Emigrationsförderung und Chemotaxis denselben Gesetzmäßigkeiten gehorchen. Es wurde daher nach experimentellen Bedingungen gesucht, die eine Abklärung der Frage erlauben, ob nur eine Wanderungsbeschleunigung oder auch eine Förderung der

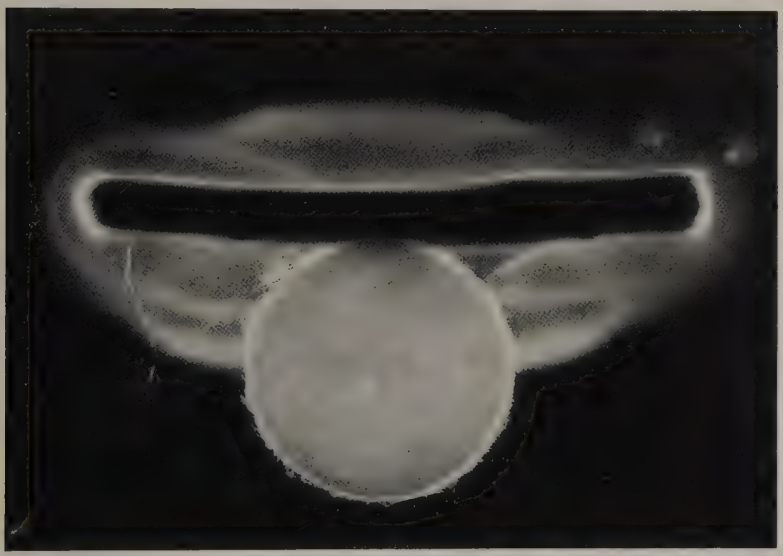


Abb. 6. „Chemotaktische" Reaktion von Leukocyten aus einem buffy coat Streifen. Kreisrundes Filtrierpapier getränkt in PPS 10^{-6}

Mobilisierung der im Explantat liegenden Leukocyten für die Auswanderungsförderung verantwortlich ist. Kinematographische Aufnahmen ergeben, daß Leukocyten unter PPS-Einwirkung früher aus dem Explantat austreten. In der zweiten Versuchsstunde ist die Geschwindigkeit der im Verband wandernden Leukocyten bei Versuch- und Kontrollkultur nahezu gleich groß. Nach Ablauf der 2. Std bleibt unter Einwirkung der PPS die Wanderung noch einige Stunden im gleichen oder verstärktem Umfange erhalten, während die Kontrollleukocyten zunehmend langsamer wandern. Nach Ablauf von 9—18 Std ist bei den Kontrollen ein Stillstand erreicht, unter PPS-Einfluß wandern Leukocyten wesentlich länger. Es besteht der Effekt der PPS somit zu einem wesentlichen Teil darin, daß die Leukocyten früher, zum Teil rascher und vor allem länger auswandern und daß besonders bei großen Explantaten auch mehr Leukocyten mobilisiert werden. Dieser Effekt ist somit die Ursache der eintretenden Reaktionen.

Diskussion

Das Ergebnis der vorstehenden Versuche erlaubt eindeutige Schlußfolgerungen in verschiedenen Richtungen.

Die Anhäufung der Leukocyten im buffy coat Stück bietet für die Reaktion der Zellen besondere Bedingungen. Auswanderungsgröße und Richtung sind durch die Form des buffy coat Stückes und die Konzentration der Leukocyten in diesem wesentlich mitbestimmt. Ein Auswanderungsoptimum nach Zahl der auswandernden Zellen wie nach Größe des Areals ist bei einer mittleren Größe (2—4 mm Kantenlänge) des Stückes vorhanden. Bei kleinsten Stücken sind beide Werte relativ ungünstiger. Ebenso scheint bei ganz großen Stücken eine relativ geringere Auswanderung vorzukommen. Das Emigrationsverhalten der einzelnen Leukocyten wird also durch die Anordnung in einem „Kollektiv" beeinflußt. Zellen des Mesenchyms zeigen in der Gewebekultur ganz allgemein die Tendenz, sich in einem gegebenen Raum in einer bestimmten Dichte anzuordnen. Diese Eigenschaften komplexer Natur müssen wohl die Ursache des Verhaltens der Leukocyten sein. Dabei mögen Kollisionshemmungen oder stoffliche Einflüsse aus den Leukocyten oder aus dem Milieu mitbestimmend sein. Es müssen somit besondere Faktoren, die sich aus der Relation Zellkonzentration zu freiem Raum ergeben, für die Auswanderung wichtig sein, oder anders gesagt, diese Verhältnisse müssen in irgendeiner Weise die Tendenz der Leukocyten zur gerichteten Auswanderung bestimmen.

Erkennt man diese Erwägung an, so ergeben sich für das Zustandekommen der Steigerung der gleichmäßigen zirkulären Wanderung durch PPS folgende Erklärungsmöglichkeiten. Die Vergrößerung der Zone kann zustandekommen

1. durch Auswandern von mehr Zellen,
2. durch schnelleres Auswandern einer gleichen Zahl von Zellen,
3. durch längeres Auswandern einer gleichen oder einer erhöhten Zahl von Zellen.

Die bisherigen Beobachtungen sprechen dafür, daß mehr Zellen auswandern und diese länger ihre Beweglichkeit behalten.

Durch Mobilisierung größerer Zellmassen aus dem Explantat wird bei gleicher Ausbreitungstendenz ein größerer Raum benötigt und eine längere Zeit Bewegung „erzwungen". In unserer Versuchsanordnung ergibt sich daraus ein größerer zurückgelegter Weg, der aber nicht notwendigerweise aus einem rascheren Wandern, sondern auch aus einem längeren Wandern resultieren kann. Der Unterschied der Auswanderungstendenz bei großen und kleinen Stücken bleibt, wie ohne Zusatz von PPS, bestehen. Es sind also gleiche Grundphänomene vorliegend, die von der Zellmasse bestimmt werden.

Es muß allerdings trotz der bei großen und kleinen Stücken vorhandenen Gleichheit der Versuchbedingungen doch erwogen werden, ob nicht trotz allem Differenzen für die Auswanderungsreaktion der Leukocyten bestehen. Denkbar ist, daß die Leukocyten bei der Gerinnung des flüssigen Plasmas verschieden beeinflußt werden, je nachdem, ob jede einzelne Zelle mit dem gerinnenden Fibrin in Beziehung tritt oder nicht. Es ist weiterhin denkbar, daß die größeren oder kleineren Leukocytenstücke die für die Auswanderung wichtige Richtung des Fibringerinnsels verschieden beeinflussen.

Wir haben früher beschrieben, daß nahe aneinander liegende Leukocytenkulturen, deren Auswanderungszonen normalerweise sich voneinander distanzieren, unter PPS-Einfluß konfluieren[11]. Die Leukocyten wandern aus dem buffy coat Stück mit größerer „Intensität" aus, die Förderung hebt die somit am Auswanderungsrande auftretende „Kollisionshemmung" auf. Es besteht daher auch hier unter PPS-Einfluß eine Verschiebung der Relation Auswanderung zu freiem bzw. gefülltem Raum.

Man kann den Versuch machen, zwischen der Masse der explantierten Leukocyten und der Größe der Auswanderungszone eine Beziehung herzustellen. Diese Größe würde angeben, in welchem Raume sich die auswandernden Leukocyten ausbreiten bzw. welchen Raum der einzeln auswandernde Leukocyt beansprucht. Während der Durchmesser der Auswanderungszone das Maß für die Wegstrecke der Wanderung darstellt, gibt die gesamte Größe der Auswanderungszone in Beziehung zum explantierten Stück ein Bild über die Beteiligung der Leukocytenmasse an der Auswanderung. Dieses Auswertungsverfahren wird hauptsächlich für Fibroblasten-Kulturen verwendet, wo es eine etwas andere Bedeutung hat, indem es die zugewachsene Masse der Zellen in Relation zur eingesetzten Gewebsmenge bringt. Die zahlenmäßigen Werte der Beziehung Mutterstück zur Auswanderungszone bei Leukocyten ergeben, daß dieses Verhältnis bei kleineren eingesetzten Stücken relativ größer ist und bis zu den größten Kulturen abnimmt (Tab. 2). Dieser Verhältniswert sagt naturgemäß aus, daß bei den kleinen Kulturen in Beziehung zur eingesetzten Leukocyten-Masse ein größerer Raum erfüllt wird als bei den optimal auswandernden. Es könnte daraus der Schluß gezogen werden, daß optimale Auswanderung nur dann auftritt, wenn in der Auswanderungszone eine bestimmte Dichte der Leukocytenkonzentration erhalten wird. Da diese bei den kleinen Mutterstücken nicht gegeben ist, wird die maximale Wegstrecke, die die Leukocyten wandern könnten, nicht durchlaufen. Daß bei ganz großen Kulturen eine gewisse verminderte Auswanderung statt hat, müßte bei dieser Deutung auf einen andern bisher unbekannten Faktor zurückgeführt werden. Für die Interpretation der Polysaccharidwirkung würde sich daraus ergeben, daß die Polysaccharide

nur dann ihren Effekt ausüben, wenn eine genügende Dichte der Leukocytenkonzentration im Stück und der Auswanderungszone vorliegt; deren Einfluß wird durch Polysaccharide in irgendeiner Weise gesteigert und ist dadurch die Ursache der Polysaccharidwirkung.

Diese vorgeschlagene Deutung der Befunde scheint die bisher beobachteten Phänomene erklären zu lassen.

Das Problem der „chemotaktischen Reaktion" der Leukocyten ergibt sich bei der buffy coat Auswanderung entsprechend den vorstehenden Auffassungen in folgender Weise. Es ist zwischen zwei Arten von „Chemotaxis" zu unterscheiden, deren eine durch Richtungsänderung der Leukocyten auf das Objekt zu, deren andere durch vermehrte und je nach PPS-Konzentration raschere Auswanderung der Leukocyten auf das Objekt zu, aber ohne Richtungsänderung erfolgt. Die erste Art der Chemotaxis von Leukocyten wurde beschrieben von Comandon[3], McCutcheon[5] und Harris[4]. Alle drei Forscher, und besonders schön Harris, konnten zeigen, daß eine Änderung der Wanderungsrichtung einzeln wandernder Leukocyten nur innerhalb sehr kleiner Distanzen von Leukocyten zu „Chemotaxin" erreicht werden kann. Bei unscharfen Rändern oder leichter Streuung des chemotaktischen Substrates ist das Phänomen nicht mehr festzustellen. Die zweite Art der Chemotaxis, wie sie in Gewebekulturen von Leukocyten auftritt, stellt eine exzentrisch verstärkte Leukocytenwanderung über wesentlich größere Distanzen in der Richtung auf das wirksame Agens dar. Ihr Verlauf und ihre Stärke ist von der Distanz wirksames Agens zu buffy coat Stück abhängig. Eine Diffusion oder fortschreitende Veränderung des Nährmediums, in das die Leukocyten auswandern, ist deshalb anzunehmen. Substanzen wie Stärke und Glykogen (Chambers u. Grand[2]) oder abgetötete Staph. albus und deren Extrakt, die zu chemotaktischer Reaktion einzeln wanderer Leukocyten führen, zeigen in der gewebezüchterischen Versuchsanordnung keinerlei Wirkung. Auf der andern Seite konnten wir mit Bact. friedländeri und dessen Polysaccharid eine gute Wirkung erzielen, während Harris mit diesem Bact. keine chemotaktischen Effekte erhält. Auch mit PPS läßt sich in der Anordnung von Harris mit

Tabelle 2

Einfluß der Explantatgröße auf die normale und auf die durch PPS geförderte Leukocytenemigration

Kantenlänge des Explantates etwa mm	$\frac{B_K - A_K}{A_K} = K$	$\frac{B_V - A_V}{A_V} = V$	$\frac{V}{K}$
5	0,84	2,04	2,43
4	1,12	2,20	1,96
3	2,40	4,28	1,78
2	2,83	5,10	1,80
1	2,90	3,22	1,11
0,5	9,61	9,00	0,94

A Explantatfläche; *B* Auswanderungsareal; *K* Kontrolle; *V* Versuch 10^{-8} PPS.

menschlichen Leukocyten keine Anlockung erzielen. Es scheint somit, daß der Ursache und dem Charakter nach differente Phänomene vorliegen.

In verschiedenen Versuchsanordnungen ist es uns nicht gelungen, die aus dem Explantat gerichtet auswandernden Leukocyten aus ihrer Wanderungsrichtung abzulenken.

Eine Chemotaxis im Sinne einer „Anlockung" mit Richtungsänderung der Leukocyten liegt demnach bei der von uns bearbeiteten exzentrischen Auswanderungsförderung durch PPS anscheinend nicht vor.

Es bleibt die Frage zu entscheiden, ob die exzentrische Auswanderungsförderung darauf beruht, daß der einzelne Leukocyt in der Zeiteinheit einen größeren Weg zurücklegt. Dafür sprechen die Befunde von Butter und Thomas[1]. Diese Forscher fanden nach parenteraler Applikation von PPS in einer anderen Versuchsanordnung in vitro an einzelnen Leukocyten eine Wanderungsbeschleunigung. Es wäre jedoch denkbar, daß in dieser Anordnung vom Zeitpunkt der Applikation bis zur Blutentnahme im Organismus sekundäre wirksame Stoffe entstanden sind, welche die Beweglichkeit der aus dem Knochenmark mobilisierten Leukocyten stimulieren. Allein dürfte aber dieser Faktor nicht maßgebend sein, da die Leukocyten sich verschieden verhalten, wenn PPS auf verschieden große Explantate einwirkt. Wenn nur die Beweglichkeit durch PPS gleichartig gesteigert wäre, so sollte erwartet werden, daß der Weg, den die Leukocyten der großen und kleinen Explantate zurücklegen, derselbe ist, denn sie werden von der gleichen Konzentration PPS beeinflußt. Auch die „chemotaktische Reaktion" ist bei sehr kleinen Explantaten geringer als bei größeren.

Es spricht somit alles dafür, daß die „chemotaktische Reaktion" in Gewebekulturen den gleichen Prinzipien gehorcht wie die Auswanderungsförderung durch PPS. Sie ist eine durch die Anordnung der Leukocyten und das wirksame Agens hervorgerufene vermehrte und verlängerte exzentrische Auswanderung der Leukocyten in schon determinierter Richtung, die unter bestimmten Verhältnissen eintritt.

Die Anhäufung von Leukocyten am äußersten Rand der „chemotaktischen Reaktion" läßt sich zwanglos mit einer „toxischen" Wirkung auf die Leukocyten bei zu großer PPS-Konzentration erklären, wie dies aus Dosierungskurven am Emigrationstest hervorgeht[8].

Es bleibt nun noch eine Möglichkeit, daß die Wirkung auf einzelne Leukocyten durch den gleichen Mechanismus erfolgt, nämlich daß die Leukocyten aus den wirksamen PPS Umwandlungsprodukte bilden, die erst die „chemotaktische Reaktion" bedingen. Ist der einzelne Leukocyt nicht imstande, diese Situation herzustellen, so tritt die „chemotaktische" Reaktion nicht auf. Ist diese Ansicht richtig, so müßte für die

Reaktion der einzelnen Leukocyten eine andere Form des wirksamen Agens, bei der dies Gefälle hervorgebracht werden kann, wirksam sein, z. B. bei der Adsorption einer kleinen Menge des wirksamen Agens an einem korpuskulären Träger wie das Bacterium. Diese Frage wäre zu prüfen.

Es ist somit wohl eindeutig, daß die Leukocytenreaktion auf PPS in der Anordnung der Gewebekultur einen besonderen Wirkungstypus der Aktivierung der Leukocyten darstellt. Auch diese Art von Reaktion kann sehr wohl die Ursache der bei der Entzündung auftretenden Anhäufung von Leukocyten sein, nur entspricht sie vielleicht nicht ganz der bisher üblichen Auffassung des Zustandekommens derselben. Andererseits kann diese Reaktion aber auch ein Modell der Mobilisierung der Zellen aus den Depots darstellen, was die durch PPS im Tier hervorgerufene Leukocytose erklären würde. Die weitere Aufklärung des Mechanismus der Wirkung in vitro and in vivo dürfte somit in verschiedenem Zusammenhang von erheblichem Interesse sein.

Summary

Lipopolysaccharides from the culture medium of Proteus vulgaris *OX 19* (PPS) affect the emigration of leucocytes as follows: where the leucocytes are in tissue cultures emigrating from square pieces of buffy coat measuring approximately 2×2 mm., the PPS increase circular emigration when added to the medium; when the PPS are applied in active concentration excentrically to the piece, they cause unilateral chemotactic emigration.

Optimum conditions for the promotion of emigration and for the "chemotactic" reaction exist only when the pieces of buffy coat containing the leucocytes are of a certain size. Where very small pieces are used or where the leucocytes are distributed diffuse throughout the plasma clot, no reaction takes place.

If suboptimal pieces are re-assembled to form pieces of optimum size, both promotion of emigration as well as chemotaxis occur again in the normal manner.

In the case of parallel emigration of leucocytes from the longitudinal edges of pieces of buffy coat measuring 2×20 mm., the "chemotactic" reaction to objects containing PPS shows directed leucocyte emigration over a longer distance and with greater intensity; the leucocytes are not diverted from their original direction of emigration.

It appears from these findings that circular emigration promotion and "chemotactic" emigration and accumulation are due to the emigration promoting effect of the PPS. The form the reaction takes differs owing to the fact that in the one instance the agent exerts a diffuse action throughout the milieu, whereas in the other instance it acts as an

excentric zone of diffusion. For the two reactions to occur, there must be a primary accumulation of leucocytes in the buffy coat.

The conclusions to be drawn from these findings as regards the mechanism by which leucocytes accumulate in an inflammatory area, and their dispersal from depots are discussed together with the mechanism of the "chemotactic" effect.

Literatur

[1] Butter, M. und A. Thomas: Münch. med. Wschr. **98**, 1240 (1956).
[2] Chambers, R., and C. G. Grand: J. cell. comp. Physiol. **8**, 1 (1936); **9**, 165 (1936).
[3] Comandon, J.: C. R. Soc. Biol. (Paris) **82**, 1171 (1919).
[4] Harris, H.: J. Path. Bact. **66**, 135 (1953).
[5] McCutcheon, M.: N. Y. Acad. of Sci. **59**, 941 (1955).
[6] Meier, R., u. B. Schär: Experientia (Basel) **10**, 376 (1954).
[7] Meier, R., P. A. Desaulles u. B. Schär: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 104 (1955).
[8] Meier, R., B. Schär u. F. Kradolfer: Experientia (Basel) **11**, 180 (1955).
[9] Meier, R., u. B. Schär: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **307**, 103 (1957).
[10] Schär, B., u. R. Meier: Experientia (Basel) **11**, 272 (1955).
[11] Schär, B., F. W. Kahnt u. G. Huber: Helv. physiol. pharmakol. Acta **15**, 116 (1957).

Professor Dr. R. Meier, Forschungslaboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung. Basel/Schweiz

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 120—125 (1958)

Aus der I. Univ.-Frauenklinik Wien
(Vorstand: Prof. Dr. T. Antoine)

Der Einfluß der Semikastration auf Cyclus und Fertilität bei weißen Ratten

Von
J. Spurny

(Eingegangen am 5. April 1958)

Vor Beginn von Versuchsserien mit jugendlichen weiblichen Ratten war bei dem seit Jahren an der I. Univ.-Frauenklinik verwendeten Glaxostamm aufgefallen, daß eingestreut zwischen normalen Cyclen und Östren Cyclusverlängerungen bis zu 20 Tagen und verlängerte Östren bis zu 120 Std und mehr auftraten. Allgemein werden für den Östrus bei Ratten im geschlechtsreifen Alter 10—18 Std angegeben (Jaffé). In einer längeren Versuchsreihe sollte deshalb der Cyclus und die Östrusdauer untersucht und nachgewiesen werden, ob die Östrusverlängerung durch ein Überschneiden der Wirkstoffabgabe von beiden Ovarien ausgelöst wird. Eine Klärung des Problems hofften wir durch die Semikastration zu erreichen. Gleichzeitig sollte die Fertilität bei jungen und älteren Rattenweibchen nach Semikastration untersucht werden, worüber im folgenden berichtet wird.

Methodik

Zur Verwendung kamen 1. 20 geschlechtsreife, virginelle Ratten eines an der Klinik gezogenen Glaxo-Inzuchtstammes im Gewicht zwischen 100—120 g, und 2. 10 weibliche Ratten im Gewicht von 150—180 g, die bereits einmal oder mehrere Male geworfen hatten. Sie wurden in Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt und während der gesamten Versuchsdauer von 14 Monaten unter möglichst konstanten Umweltsbedingungen gehalten. Sie erhielten Standardkost („Industriefutter T 8" der Fa. Tagger-Graz) und Wasser ad libitum. In einer Vorperiode von 8 Wochen wurde durch täglich morgendlich vorgenommene Scheidenabstriche der Cyclus der Tiere beobachtet, seine Länge und die Östrusdauer festgelegt.

Die Smearentnahme erfolgte mittels einer Glaspipette. Zu dieser Art der Sekretentnahme haben wir uns deshalb entschlossen, um dadurch nicht nur während der langen Abstrichdauer eine Reizung der Vaginalschleimhaut zu vermeiden, sondern auch eine gründlichere Sekretentnahme zu ermöglichen. Trotz täglicher Scheidenabstriche haben wir in keinem Fall eine Colpitis gesehen, welche die Beurteilung des cytologischen Bildes gestört hätte. Die Abstriche wurden mit Methylenblau gefärbt und täglich befundet. Die Beurteilung erfolgte nach den üblichen Kriterien.

Die Semikastration wurde nach diesen 8 Wochen, um bei allen Tieren möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten, zu Beginn eines Östrusstadiums durchgeführt. Bei allen Tieren wurde das linke Ovar in typischer Weise von der seitlichen Bauchwand aus entfernt, wobei darauf geachtet wurde, daß bei der Abtragung des

Ovars die Tube miterfaßt wurde. Die tägliche Sekretentnahme wurde durch weitere 8 Wochen fortgesetzt. Anschließend an diese Periode von 4 Monaten wurden Scheidenabstriche nur mehr in 4wöchentlichen Abständen durch je 7 Tage abgenommen, um auszugsweise die weitere Funktion des verbliebenen Ovars zu kontrollieren. Zu diesen Intervallen haben wir uns deshalb entschlossen, um einen eventuellen Stimulus durch den Reiz des täglichen Abstreichens zu vermeiden.

Um die Fertilität der semikastrierten Tiere zu überprüfen, haben wir nach 9monatiger Versuchsdauer den einzelnen Versuchsgruppen Rattenmännchen zugesellt und diese durch 5 Monate hindurch mehrfach ausgetauscht und durch andere ersetzt. Bei Beendigung des Versuches hatten die Tiere ein Alter etwa zwischen 17 und 21 Monaten erreicht. Sie wurden mit Äther getötet, Vagina, Uterus und Ovar herauspräpariert, in Formalin fixiert und dem üblichen histologischen Untersuchungsgang unterzogen.

Ergebnisse

In der Beobachtungszeit vor der Semikastration traten bei allen Gruppen, wobei unter A) die virginellen, unter B) die älteren Tiere aufscheinen, die Cyclen mit Längen von 2—6 Tagen am häufigsten auf (diese Längen wurden von Östrus zu Östrus gerechnet, die Spitze selbst

Tabelle 1

Gruppe A	vor Semikastration			Prozentzahl		nach Semikastration			Prozentzahl	
	ges.	norm.	verl.	norm.%	verl.%	ges.	norm.	verl.	norm.%	verl.%
I	48	41	7	85,5	14,5	44	37	7	84	16
II	48	44	4	91,8	8,2	46	39	7	84,8	15,2
III	47	42	5	89,4	10,6	42	37	5	88	12
IV	51	49	2	96	4	43	33	10	76,7	23,3
Gesamt	194	176	18	90,7	9,3	175	146	29	83,4	16,6

Tabelle 2

Gruppe B	vor Semikastration			Prozentzahl		nach Semikastration			Prozentzahl	
	ges.	norm.	verl.	norm. %	verl. %	ges.	norm.	verl.	norm. %	verl. %
V	39	31	8	79,5	20,5	33	26	7	78,8	21,2
VI	37	35	2	94,5	5,5	31	21	10	67,7	32,3
Gesamt	76	66	10	87	13	64	47	17	73	27

lag zwischen 4.—5. Tag), so daß wir diese Cycluslängen für unser Tiermaterial als der Norm entsprechend ansehen können. Um nun einen Vergleich zu ermöglichen, haben wir vor und nach der Semikastration jeweils gleiche Zeiträume eingehalten und beobachtet. Die Ergebnisse bezüglich der Cycluslänge bei Gruppe A vor und nach der Semikastration gehen aus Tab. 1 hervor. Tab. 2 bringt unter gleichen Gesichtspunkten zusammengefaßt die Ergebnisse der Gruppe B. Ein Tier war nicht verwertbar, da es bald nach der Operation einging.

Bezüglich der Östrusdauer haben wir beim täglichen Abstreichen der Tiere am Morgen ein Östrusstadium, das auch noch am 2. Tag aufschien (somit 24 Std dauerte), als normal bezeichnet, da dieser Typus am häufigsten auftrat. Ein über den 3. Abstrichtag andauernder Östrus (somit über 48 Std anhaltender), wurde als verlängert bezeichnet. Tab. 3 zeigt die normalen und verlängerten Östren der Gruppe A vor und nach der Semikastration mit Prozentzahlen.

Tabelle 3

Gruppe A	vor Semikastration			Prozentzahl		nach Semikastration			Prozentzahl	
	ges.	norm.	verl.	norm. %	verl. %	ges.	norm.	verl.	norm. %	verl. %
I	48	43	5	89,5	10,5	44	37	7	84	16
II	48	45	3	94	6	46	37	9	80	20
III	47	44	3	93,6	6,4	42	38	4	90,5	9,5
IV	51	44	7	86	14	43	37	6	86	14
Gesamt	194	176	18	90,7	9,3	175	149	26	85,1	14,9

Tab. 4 bringt in gleicher Weise die Ergebnisse der Gruppe B.

Tabelle 4

Gruppe B	vor Semikastration			Prozentzahl		nach Semikastration			Prozentzahl	
	ges.	norm.	verl.	norm. %	verl. %	ges.	norm.	verl.	norm. %	verl. %
V	39	34	5	87	13	33	26	7	79	21
VI	37	35	2	94,5	5,5	31	23	8	74	26
Gesamt	76	69	7	90,8	9,2	64	49	15	76,5	23,5

Bei den weiteren 4 wöchentlichen, jeweils durch 7 Tage durchgeführten Kontrollabstrichen, konnten in Gruppe A bis zum Versuchsende immer wieder Östren gefunden werden. (1 Tier ging nach 13 Monaten ein.) In Gruppe B starb 1 Tier nach der 17. Versuchswoche, 2 weitere nach insgesamt 10 Monaten. Die verbleibenden 6 Tiere zeigten bei der Abstrichkontrolle vor der Tötung keinen Östrus mehr. Bezüglich der Fertilität konnte nur bei 2 Tieren der Gruppe A eine Schwangerschaft festgestellt werden. Diese war knapp vor der Tötung der Tiere eingetreten. Bei dem einen Tier fand sich ein Embryo, bei dem anderen 3 Embryonen in dem dem verbliebenen Ovar zugehörigen Uterushorn.

Histologie

Die mikroskopische Untersuchung von Cervix, Uterus und dem verbliebenen Ovar ergab dem Cyclusstadium bei der Tötung der Tiere entsprechende normale Befunde. Bei 4 Tieren allerdings zeigten sich beträchtliche cystische Veränderungen im Bereich des Ovars. Bei Tier 5

der Gruppe A/III, Tier 2 der Gruppe A/IV und Tier 2 der Gruppe B/V fanden sich Cysten, die von der Bursa ovarica ausgingen. Bei Tier 1 der Gruppe A/IV wurde eine intraovarielle Cyste gefunden.

Diskussion

Der Cyclus der Ratte, der die Gesamtheit einer Phasenfolge (Diöstrus-Proöstrus-Östrus-Metöstrus) darstellt, wird von Long u. Evans mit 4—6 Tagen, von Gsell-Busse mit 4—5 Tagen, Jaffé, Preisseker u. a. mit 6—8 Tagen angegeben. Für den Proöstrus wurde eine mittlere Zeit von 12 Std, für den Östrus eine solche von 10—18 Std errechnet, für die Dauer des Metöstrus 24—30 Std und für den Diöstrus wurden 50—60 Std gefunden (Jaffé).

Bei der Kontrolle unserer Tiere haben wir als häufigste Cycluslängen (gemessen von Östrus zu Östrus) solche zwischen 2—6 Tagen gefunden. Diese Cycluslängen traten in Gruppe A (virginelle Tiere) zu 90,7% auf, während nur 9,3% der insgesamt 194 beobachteten Cyclen Intervallschwankungen bis zu 20 Tagen aufwiesen. Unter diesen waren die Verlängerungen von 7—10 Tagen wieder die häufigsten.

Nach durchgeführter Semikastration fand in der gleichen Beobachtungszeit eine Verminderung der Cyclen in Gruppe A auf 175 statt, wovon 83,4% normal und 16,6% verlängert gefunden wurden. Unter den letzteren überwiegen die Verlängerungen zwischen 10—20 Tagen. Bei 3 Tieren können diese Verlängerungen als direkte Operationsfolge aufgefaßt werden, da sie unmittelbar anschließend an die Semikastration beobachtet wurden. Bei 2 dieser Tiere trat der erste Östrus erst wieder nach 17 Tagen auf, um sich anschließend zu normalisieren. Ein Tier zeigte laufend zunehmende Intervalle von 2, 9, 11, 12 und über 24 Tagen. Bei den anderen Tieren der Gruppe A traten Cyclusverlängerungen nach Semikastration eingestreut in den weiteren Cyclusablauf auf, wie sie ähnlich auch vor der Operation gefunden worden waren. Verlängerte Östren (am 3. Abstrichtag noch positiv) wurden in dieser Gruppe vor der Semikastration in 9,3% gefunden, 90,7% waren normal. Nach der Operation waren 14,9% verlängert und 85,1% normal.

Abgesehen von den oben erwähnten 3 Fällen kann gesagt werden, daß der Ausfall eines Ovars bei virginellen reifen Ratten nur einen geringen Effekt bezüglich der Cycluslänge und Östrusdauer zeitigte, d. h. fast volle Kompensation auftritt. Hatai und Arai fanden bei juvenilen Ratten nach Semikastration eine kompensatorische Hypertrophie des verbliebenen Ovars mit einer Gewichtszunahme zwischen 40—100%.

In der Gruppe B (ältere Tiere) wurden vor der Semikastration 87% normale und 13% verlängerte Cyclen, 90,8% normale und 9,2% verlängerte Östren gefunden. Nach der Semikastration jedoch stiegen die Prozentzahlen der verlängerten Cyclen auf 27% und die verlängerten Östren auf 23,5% an.

Vergleicht man nun die Gruppen A und B untereinander, so finden sich vor der Semikastration bezüglich Cycluslänge und Östrusdauer fast gleiche Werte, während nachher bei Gruppe B eine beträchtliche Verminderung der Cyclushäufigkeit mit Verlängerung der Östrusdauer auftritt. Diese augenscheinliche Veränderung nach Semikastration der älteren Tiere (B) kann wohl dahingehend ausgelegt werden, daß das verbleibende Ovar nicht mehr in der Lage war, den Ausfall einer Keimdrüse voll zu kompensieren. Nach Wiesner trat nach einseitiger Kastration alter Rattenweibchen keine kompensatorische Hypertrophie des verbleibenden Ovars auf.

Die Semikastration, die bei allen Tieren am 1. Tag des Östrusstadiums durchgeführt worden war, zeitigte bei 5 Tieren eine Fortdauer des Östrus bis zu 72 Std (2 Tiere der Gruppe A und 3 Tiere der Gruppe B). Wir haben in der Einleitung darauf hingewiesen, daß die bei unserem Rattenstamm immer wieder beobachteten verlängerten Östren uns zum Versuch der Semikastration veranlaßt haben, um damit ein Überschneiden der Tätigkeit beider Ovarien ein- oder ausschließen zu können. Da nach der Semikastration die verlängerten Östren gegenüber vorher sogar noch häufiger gefunden wurden und bei einigen Tieren, wie oben erwähnt, unmittelbar nach der Operation weiter bestanden, können wir schließen, daß der verlängerte Östrus durch ein Ovar allein hervorgerufen werden kann.

Die Überprüfung der Fertilität nach Semikastration ergab z. B. nur 2 Schwangerschaften bei den Tieren, welche etwa 12 Monate alt waren und von diesem Zeitpunkt an durch 5 Monate mit Männchen zusammen waren. Die 20 Tiere der Gruppe A standen in dieser Zeit sicher noch in ihrer Fertilitätsperiode, die von King, Steinach, Heinlein u. Wiesner vom 3.—15. Lebensmonat und von Slonacker auch darüber angegeben wird. Da wir bei einem Tier nur einen, bei einem zweiten Tier nur 3 Embryonen fanden, war durch die Semikastration, trotz Weiterbestehens annähernd normaler Cyclen, die Fertilität beträchtlich herabgemindert. Bloch konnte im Gegensatz dazu, bei Überprüfung der kompensatorischen Steigerung der Tätigkeit des verbliebenen Ovars einseitig kastrierter weiblicher Mäuse finden, daß die Fertilität, verglichen durch die Jungenzahl gegenüber intakten weiblichen Mäusen nur eine mäßige Verminderung ergab. In unserem Fall ist wahrscheinlich die lange Versuchsdauer für die hohe Fertilitätsverminderung anzusprechen.

Zusammenfassung

Bei virginellen Ratten des Glaxostammes wurde im Gegensatz zu älteren Tieren nach Semikastration keine wesentliche Änderung des Cyclusablaufes gefunden. Nach einer Versuchsdauer von 14 Monaten cyclierten die virginellen Tiere bis zur Tötung, während die älteren Tiere

bereits vorher anöstrisch wurden. Verlängerte Östren wurden auch nach der Semikastration weiter beobachtet. Die Fertilität erscheint nach der Semikastration beträchtlich herabgesetzt.

Literatur

Arai, H.: Amer. J. Anat. **28**, 59 (1920).
Bloch, S.: Gynaecologia (Basel) **133**, 87 (1952).
Gsell-Busse, M. A.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **219**, 626 (1928). — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **139**, 328 (1929).
Hatai, S.: zit. nach Bloch.
Jaffé, R.: Anatomie u. Pathologie der Spontanerkrankungen d. kleinen Laboratoriumstiere. Berlin: Springer 1931.
King, H. D.: Anat. Rec. **11**, 269 (1916); **27**, 337 (1924).
Long, J. A., u. H. M. Evans: Mem. Univ. Calif. **1922**, 6.
Preissecker, E.: in Jaffé.
Slonacker, J. R.: Amer. J. Physiol. **84**, 192 (1928).
Steinach, E., H. Heinlein u. B. P. Wiesner: Pflügers Arch. ges. Physiol. **210**, 598 (1925).
Wiesner, B. P.: Brit. med. J. **2**, 585 (1932); zit. nach Preissecker.

Dr. J. Spurny, I. Universitäts-Frauenklinik, Wien IX/Österreich, Spitalgasse 23

Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 126—132 (1958)

Aus dem Ungarischen Institut für Kardiologie, Budapest
(Direktor: Dozent Dr. G. Gottsegen)

Wirkung des Methylenblau auf das experimentelle akute Lungenödem

Von
G. Gottsegen, I. Szám und M. Csornay

(Eingegangen am 15. Januar 1958)

In früheren Untersuchungen (Gottsegen, Szám u. Csornay 1957) wurde gezeigt, daß die lytische Mixtur von Laborit und — wenn auch in geringerem Maße — ihre einzelnen Phenothiazinbestandteile eine Schutzwirkung dem durch Ammonchloridvergiftung sowie durch Hyperoxie ausgelösten akuten Lungenödem der Ratte gegenüber aufweisen. In der vorliegenden Mitteilung bezwecken wir zu prüfen, ob das älteste, bereits 1876 hergestellte und seit Ehrlichs grundlegenden Arbeiten pharmakologisch vielseitig untersuchte Phenothiazinderivat, das Methylenblau (Tetramethyldiaminophenothiazinchlorid) eine ähnliche Wirksamkeit besitzt. Dies lag um so näher, da der Farbstoff — wie von Konzett 1938 dargetan wurde — bereits über jene grundlegende Eigenschaft, Wirkungssteigerung der Schlafmittel und Narkotica, verfügt, derzufolge die später synthetisierten Phenothiazinabkömmlinge zur potenzierten Narkose herangezogen wurden.

Methodisches

Die Versuche wurden an weißen Wistar-Ratten von 175—275 g Körpergewicht ausgeführt. Akutes Lungenödem wurde teils durch intraperitoneale Einspritzung von Ammonchlorid (0,042 g/100 g Körpergewicht), teils durch 2,5—3stündigen Aufenthalt des Tieres in einer Sauerstoffkammer von 3,5 Atm. Überdruck erzeugt. Den Versuchstieren wurde eine 3%ige Lösung von Methylenblau in wechselnden weiter unten angegebenen Mengen 1 Std vor Beginn des Experimentes intraperitoneal injiziert; dieselbe Anzahl von Kontrolltieren wurde stets gleichzeitig dem das Lungenödem hervorrufenden Agens ohne Vorbehandlung ausgesetzt. Die angewandten Dosen von Methylenblau — 0,0005—0,003 g/100 g Körpergewicht — lagen stets weit unter der toxischen Grenze, da Ratten bis zu 0,05 g anstandslos vertragen (Führer). Weitere Einzelheiten der Methodik sind in unseren früheren Mitteilungen (Gottsegen, Szám u. Csornay 1954, 1956, 1957) enthalten.

Versuchsergebnisse

18 Ratten der ersten Versuchsserie wurden mit Methylenblau (0,003 g/100 g Körpergewicht) vorbehandelt; die Dosis wurde auf Grund unserer früheren Experimente mit lytischer Mischung gewählt und entsprach in der Größenordnung der Summe des darin enthaltenen Chlorpromazins (0,001 g/100 g Körpergewicht) und Promethazins (0,024 g/100 g

Körpergewicht). Eine Stunde danach haben wir sowohl diesen, als auch 19 Kontrolltieren Ammonchloridlösung intraperitoneal injiziert. 4 Tiere der ersten und 3 der zweiten Gruppe sind innert 20 min gestorben; diese wurden im weiteren nicht berücksichtigt, da unseren in früheren Arbeiten (1954, 1957) niedergelegten Erfahrungen gemäß es bei dieser kurzen Lebensdauer nicht zur Entwicklung eines beträchtlicheren Lungenödems kommen kann. Ein Kontrolltier wies bei der Sektion schwere, chronisch-eitrige bronchopulmonale Veränderungen auf — mit dem extrem hohen relativen Lungengewicht von 2,51 — und wurde deshalb aus der Serie ausgeschieden. Es blieben danach 14 Versuchs- und Kontrolltiere. Von letzteren waren nach Ablauf 1 Std nur 2, von den Vorbehandelten 8 am Leben, die übrigen sind in 20—50, durchschnittlich 32 min (Kontrollgruppe), bzw. 25—40, durchschnittlich 31 min (Versuchstiere) eingegangen. Die Überlebenden wurden durch konzentrierte Ätherdämpfe getötet und mit den während der Versuchszeit verstorbenen zusammen verarbeitet. Die histologischen Präparate eines Versuchstieres und von 3 Kontrollratten sind vor der Auswertung irrtümlicherweise vernichtet worden, deshalb enthält Tab. 1 nur bezüglich 13, bzw. 12 Tiere entsprechende Angaben; die relativen Lungengewichte stellen jedoch Mittelwerte der ganzen Gruppe dar. Nahezu zwei Drittel der vorbehandelten Gruppe erwies sich als ödemfrei bei der histologischen Untersuchung der Lungen (die identischen Zahlenwerte bedeuten keineswegs, daß alle nach 60 min getöteten Ratten ödemfrei waren), auf die ganzen Lungen (+++) oder auf einzelne Lappen (++) erstreckendes Ödem fand sich nur bei 4 Ratten dieser Gruppe. Kein einziges der Kontrolltiere blieb hingegen ödemfrei; in 3 wurden zumindest zerstreute Herde (+), in 9 weitergehende Veränderungen nachgewiesen. Das relative Lungengewicht war ebenfalls wesentlich größer in der Kontrollgruppe (1,61 $\pm$ 0,074), als unter den Vorbehandelten, obwohl deren Mittelwert von 1,24 $\pm$ 0,096 immerhin auf einen mäßig erhöhten Flüssigkeitsgehalt des Organs hinweist.

10 in gleicher Weise vorbehandelte Ratten sind mit derselben Anzahl von Kontrolltieren der Einwirkung des Sauerstoffes unter hohem Drucke ausgesetzt worden. 3 Methylenblautiere und eine Kontrolle sind bereits während der Expositionszeit, die übrigen innert 30 min nach Verlassen der Überdruckkammer eingegangen; es gab keine Überlebende in dieser Serie. Bei 7 mit dem Farbstoff injizierten Ratten konnten keine Spuren von Lungenödem nachgewiesen werden, kein Tier der Kontrollgruppe blieb hingegen ödemfrei (Tab. 1). Ödematöse Durchtränkung beider Lungen war bei 5 Kontrolltieren, jedoch nur bei einem vorbehandelten Tier nachweisbar. Auch war das mittlere relative Lungengewicht der Vorbehandelten nahezu normal, während der hohe Wert bei den Kontrolltieren auf schweres Ödem hinwies. Bezüglich sonstiger Eigenheiten des

mikroskopischen Bildes — Blutreichtum, Desquamation, Infiltration, Atelektase — bestand kein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Nachdem das Salmiaködem durch Methylenblau nicht vollständig verhindert wurde — was weniger am histologischen Bilde als an dem Gewichtsindex zum Ausdruck kam — untersuchten wir, ob die Resultate

Tabelle 1

Hemmung des akuten Lungenödems durch Methylenblau (0,003 g/100 g Körpergewicht)

	Ammonchlorid-Vergiftung		Sauerstoff-Vergiftung	
	Vorbehandelte	Kontrolltiere	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++)	2	5	1	6
Lungenödem (++)	2	4	1	3
Lungenödem (+)	1	3	1	1
Ödemfrei	8	0	7	—
Überlebend	8	2	—	—
Rel. Lungengewicht $\left(\frac{\text{Lungengewicht} \times 100}{\text{Körpergewicht}}\right)$	1,24 ± 0,096	1,61 ± 0,074	1,05 ± 0,096	1,85 ± 0,13

durch gleichzeitige Injektion von Dolantin gebessert werden können; hierdurch sollte der Effekt der lytischen Mixtur — in der die Phenothiazinkörper diesmal durch Methylenblau vertreten sind — reproduziert werden. So erhielten 17 Ratten 0,003 g Methylenblau + 0,002 g Dolantin/100 g Körpergewicht 1 Std vor der Ammonchloridinjektion, ebenfalls intraperitoneal; 19 Tiere dienten zur Kontrolle. Von den Vorbehandelten sind 7, von den Kontrollen 4 innert 20 min eingegangen und konnten aus dem oben angeführten Grunde nicht verwertet werden; die Sektionsbefunde der übrigen sind in Tab. 2 zusammengefaßt. 6 Versuchstiere waren 60 min nach der Salmiakverabreichung noch am Leben und wurden getötet, 4 starben nach 20—31, durchschnittlich 26 min (werden die aufgeopferten hinzu gerechnet, beträgt die mittlere Lebensdauer der Gruppe 46 min). Unter den Kontrollen gab es keine Überlebende. Sämtliche Tiere sind 21—55, durchschnittlich 36 min nach der Vergiftung eingegangen. In der Versuchsgruppe zeigte nur ein einziges Tier kleine Herde von Lungenödem; demgegenüber besaß die überwiegende Mehrzahl der Kontrolltiere schwer-ödematöse Lungen.

Tabelle 2. *Hemmung des Ammonchlorid-Lungenödems durch Methylenblau + Dolantin*

	Vorbehandelte	Kontrolltiere
Lungenödem (+++)	—	7
Lungenödem (++)	—	4
Lungenödem (+)	1	—
Ödemfrei	9	4
Überlebend	6	—
Rel. Lungengewicht	0,96 ± 0,067	1,62 ± 0,107

Auch war das relative Lungengewicht normal in der ersten und wesentlich erhöht in letzterer Gruppe.

Zur Ermittelung der niedrigsten wirksamen Dosis von Methylenblau wurden je 10 Tiere mit 0,002, 0,001 und 0,0005 g des Farbstoffes pro 100 g Körpergewicht vorbehandelt. Die Experimente sind an der Hyperoxie ausgesetzten Tieren vorgenommen worden, da diese Ödemform durch die ursprüngliche Dosis von 0,003 g fast vollkommen verhindert

Tabelle 3. *Einfluß verschiedener Methylenblaudosen auf das Sauerstoff-Lungenödem.* Die Ratten der Serie A erhielten 0,002 g, die der Serie B 0,001 g, die der Serie C 0,0005 g des Farbstoffes pro 100 g Körpergewicht. K_1: gemeinsame Kontrolle der Gruppe A und B. K_2: Kontrolltiere der Gruppe C

	A	K_1	B	C	K_2
Lungenödem (+++)	—	5	—	9	10
Lungenödem (++)	—	4	—	1	—
Lungenödem (+)	4	1	8	—	—
Ödemfrei	6	—	2	—	—
Überlebend	—	—	—	—	—
Rel. Lungengewicht	1,06±0,029	1,46±0,069	0,91±0,031	1,59±0,094	1,54±0,052

wurde. Die ersten zwei Gruppen sind gleichzeitig und mit einer gemeinsamen Kontrolle in Versuch genommen worden; zu den mit der niedrigsten Dosierung behandelten Tieren gehört eine besondere Kontrollgruppe. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, hat kein einziges Tier die Sauerstoffvergiftung überlebt; sie starben ausnahmslos während der dreistündigen Exposition, oder innert der nachfolgenden 20 min. Histologisch beurteilt, stehen die mit 0,002 g erzielten Erfolge denen der Volldosis keineswegs nach und auch 0,001 g/100 g Körpergewicht schützte noch 2 von 10 Tieren. Nennenswertes Lungenödem war bei keinem Tier dieser Gruppen, hingegen bei 9 unter 10 Kontrolltieren nachweisbar. Die Anzahl völlig ödemfreier Ratten war immerhin größer bei höherer Dosierung; dies kam jedoch in den Lungengewichten keineswegs zum Ausdruck: das relative Lungengewicht bei den mit 0,001 g vorbehandelten Tieren war noch etwas niedriger, als bei denjenigen, die höhere Dosen erhielten. Die Injektion von nur 0,0005 g erwies sich hingegen als vollkommen wirkungslos: weder bezüglich des mikroskopischen Bildes der Lunge, das in jedem Falle hochgradiges Ödem zeigte, noch der hohen relativen Lungengewichte konnten irgendwelche Unterschiede zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren nachgewiesen werden.

8 Ratten sind während der ganzen Dauer der Salmiakvergiftung nach Vorbehandlung mit Methylenblau (0,003 g/100 g Körpergewicht) elektrokardiographisch kontrolliert worden. Die die Entstehung des Ammonchloridödems regelmäßig begleitende irreversible Bradykardie war nur bei 3 Ratten nachweisbar, deren eine jedoch nur eine recht mäßige

Verlangsamung der Herzaktion aufwies. Bei 3 Ratten kam es nur zu vorübergehender Bradykardie, ihre Normalfrequenz kehrte nach einigen Minuten wieder. Diese wurde von 2 Tieren dauernd bewahrt. Alle Tiere, bei denen keine dauernde Verlangsamung der Herzaktion zustandekam, blieben am Leben und erwiesen sich ödemfrei nach der Tötung. 2 von den 3 bradykarden Ratten gingen binnen 60 min mit schweren Lungenödem ein; das dritte Tier mit nur mäßiger Bradykardie erwies sich bei der Autopsie als ödemfrei. Das Elektrokardiogramm normaler Tiere wurde durch Injektion des Farbstoffes in keiner Weise beeinflußt.

Besprechung der Ergebnisse

Über eine Wirkung des Methylenblau beim akuten Lungenödem fanden wir eine einzige Angabe im Schrifttum. Nachdem die bei einer Vitamin E-armen Diät gehaltenen Ratten erhöhte Empfindlichkeit der toxischen Wirkung des Sauerstoffes gegenüber zu Tage legten (Taylor 1953), eine Anzahl charakteristischer Tocopheroleffekte hingegen durch Methylenblau reproduziert werden konnte (Aaes-Jorgensen u. Mitarb., Dam u. Granados, Moore u. Mitarb.), versuchte Taylor (1956) die O_2-Vergiftung hypovitaminotischer Tiere durch langdauernde Verfütterung des Farbstoffes abzuschwächen. Die Ergebnisse waren positiv, was die zentralnervösen Symptome, negativ, was die pulmonale Schädigung anbelangt. Die durch chronische enterale Einverleibung erzielten Resultate besagen jedoch nichts bezüglich der akuten Wirkung intraperitonealer Injektionen, mit deren Hilfe wir eine Schutzwirkung des Mittels sowohl dem Sauerstoff-, als auch dem Salmiaködem gegenüber nachzuweisen vermochten. Sie übertraf sogar die der modernen Phenothiatzinderivate, welche sich nur gegen die eine oder die andere Ödemform — Chlorpromazin gegen das Salmiak-, Promethazin gegen das hyperoxische Ödem — als wirksam erwiesen (die widersprechenden Ergebnisse von Bean, der auch das Sauerstoffödem durch Chlorpromazin zu unterdrücken vermochte, werden durch abweichende Versuchsbedingungen — sehr hoher O_2-Druck, kurze Expositionszeit, Vorherrschen cerebraler Schädigung — erklärt). Der Schutzeffekt von 0,001 g Chlorpromazin bzw. 0,0024 g Promethazin konnte mit 0,001 g je 100 g Körpergewicht Methylenblau reproduziert werden (allerdings wurden die niedrigsten wirksamen Dosen in den früheren Untersuchungen nicht ermittelt), so scheint der Farbstoff den jüngeren Phenothiazinkörpern auch in quantitativer Hinsicht keineswegs nachzustehen. Auch das Ausmaß des gewährten Schutzes — beurteilt sowohl an Hand der histologischen Bilder, wie auch der relativen Lungengewichte — ist beträchtlicher bei den mit Methylenblau als bei den mit den modernen Verwandten vorbehandelten Tieren, wenn auch dem Vergleiche verschiedener Versuchsserien nur ein beschränkter Wert zukommt; so

waren die Tiere gleicher Zucht der neurotoxischen Wirkung des Sauerstoffs gegenüber diesmal empfindlicher als in der früheren Versuchsserie, indem sie auch ohne Lungenödem ausnahmslos eingingen. Es handelt sich um Spontanschwankungen — allenfalls jahreszeitlicher Natur — der Reaktivität, denen zufolge nur Vergleiche mit Simultankontrollen als maßgebend zu betrachten sind. Durch Kombination mit Dolantin wurde der Effekt des Farbstoffes noch weiter verstärkt und übertraf den der lytischen Mixtur von Laborit — zumindest in bezug auf das Ammonchloridödem — in nicht unbeträchtlichem Maße.

Was den Mechanismus der Methylenblauwirkung anbelangt, dürfte bei dem Salmiaködem, bei dessen Entstehung Zirkulationsstörungen eine führende Rolle spielen, vor allem eine Beeinflussung des Kreislaufs angenommen werden. Hierfür sprechen unsere elektrokardiographischen Befunde: die Aufhebung der Salmiakbradykardie ging parallel mit der Unterdrückung des Lungenödems. Ein ähnlicher Effekt wurde in den früheren Untersuchungen nur bezüglich der lytischen Mischung nachgewiesen; Chlorpromazin allein konnte die Reizbildung nicht beeinflussen. Auch sind andere Kreislaufwirkungen des Methylenblau — Senkung des Blutdruckes nach vorübergehender Erhöhung (Kowalewsky, Garfounkel u. Gautrelet, zit. nach Führer); Anstieg des Minutenvolumens (Goodman u. Gilman) — bekannt. Der von Marquardt u. Schumacher beschriebene adrenolytische Effekt dürfte bei der Kupierung des Salmiaködems möglicherweise auch eine Rolle spielen, zumal König u. König der Sympathicusreizung eine überragende Bedeutung in der Genese dieser Ödemform zuschreiben. Bei der Hemmung des hyperoxischen Ödems kommt außerdem die Redoxwirkung, deretwegen der Farbstoff auch bei Intoxikationen durch Blausäure und methämoglobinbildende Gifte verwendet wird, und die Wirkung auf die Atmung (Marquardt u. Schumacher) in Betracht. Untersuchungen über die Beeinflussung der Permeabilität durch Methylenblau sind im Gange.

Zusammenfassung

Methylenblau übt eine Schutzwirkung dem durch Ammonchlorid bzw. Sauerstoff unter hohem Drucke ausgelösten Lungenödem gegenüber aus, die den ähnlichen Effekt moderner Phenothiazinderivate in mancher Hinsicht übertrifft. Wird das Salmiaködem verhindert, bleibt auch die charakteristische Bradykardie aus, was auf einen vorwiegend zirkulatorischen Angriffspunkt des Mittels bei dieser Ödemform hinweist.

Literatur

Aaes-Jorgensen, E., H. Dam and H. Granados: Acta pharmacol. (Kbh.) 7, 171 (1951).

Bean, J. W.: Amer. J. Physiol. 187, 389 (1956).

Dam, H., and H. Granados: Acta pharmacol. (Kbh.) **7**, 181 (1951); **8**, 47 (1952).
Führer, H.: in A. Heffter's Handb. exp. Pharmakol. Bd. I/B. S. 1212. 1923. Berlin: Springer.
Goodman, S. L., and A. Gilman: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics. II. ed. S. 1116. New York: Macmillan 1956.
Gottsegen, G., I. Szam u. M. Csornay: Acta Med. Acad. Sci. hung. **6**, 367 (1954). — Z. inn. Med. **11**, 551 (1956). — Arch. exp. Path. Pharmak. **230**, 435 (1957).
Koenig, H., and R. Koenig: Amer. J. Physiol. **158**, 1 (1949).
Konzett, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **188**, 349 (1938).
Marquardt, P., u. H. Schumacher: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **222**, 74 (1954). — Arzneimittel-Forsch. **4**, 223 (1954).
Moore, T., I. M. Sharman and R. I. Ward: Biochem. J. **53**, 31 (1953).
Taylor, D. W.: J. Physiol. (Lond.) **121**, 47 (1953); **131**, 200 (1956).

Dozent Dr. G. Gottsegen, Ungarisches Institut für Kardiologie, Budapest IX/Ungarn, Nagyvárad-Tér 1

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmakol., Bd. 234, S. 133—146 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Adrenalinsekretion und Adrenalinverarmung der Kaninchennebennieren nach Reserpin*

Von
G. Kroneberg und H. J. Schümann

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 8. April 1958)

In vorangegangenen Untersuchungen (Kroneberg u. Schümann) hatten wir gezeigt, daß die von dem Rauwolfia-Alkaloid *Reserpin* hervorgerufene Verarmung des Nebennierenmarks an *Adrenalin* beim *Kaninchen* durch Rückenmarkdurchschneidung in Höhe von C_6 verhindert wird. Selbst hohe Reserpindosen, die am intakten Tier zu extremer Adrenalinverarmung der Nebennieren führten, waren nach Rückenmarkdurchschneidung unwirksam. Demgegenüber hatte bei Ratten die Durchtrennung des Rückenmarks keinen Einfluß auf die Adrenalin- und Noradrenalinverarmung der Nebennieren. Auf Grund dieser Befunde waren wir zu der Vorstellung gelangt, daß die Wirkung beim Kaninchen durch einen überwiegend *zentral-nervalen*, bei der Ratte durch einen vorwiegend *peripheren* Mechanismus bedingt sei. Holtz, Balzer u. Westermann konnten durch Blockierung der *Monoaminoxydase* mit *Iproniacid* (Isopropyl — isonicotinsäurehydrazid, Marsilid) die Hormonverarmung der Nebennieren bei Ratten, nicht aber bei Kaninchen verhindern. Sie kamen zu der Schlußfolgerung, daß die Reserpinwirkung auf das Nebennierenmark bei Ratten hauptsächlich auf einer „*Freisetzung*" der Amine beruhe, die diese dem Abbau durch die Monoaminoxydase zugänglich macht, bei Kaninchen hingegen überwiegend auf einer nerval bedingten *Hypersekretion*.

Durch elektrische Splanchnicusreizung läßt sich nur schwer eine Abnahme des Hormongehaltes der Nebennieren erzielen. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Resynthese der sezernierten Hormone so schnell, daß selbst die Abgabe großer, dem ursprünglichen Gehalt der Drüse entsprechender Mengen nicht zu einer Aminverarmung zu führen braucht (Tscheboksaroff, Elliot, Hökfelt u. McLean). In Versuchen von Holland u. Schümann an Katzen mit elektrischer Stimulierung des Splanchnicus kam es innerhalb von 120 min nur zu einer geringfügigen

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Abnahme des Hormongehaltes, obwohl die abgegebenen Mengen mehr als 50% des ursprünglichen Hormongehaltes des Nebennierenmarks betrugen.

Wenn deshalb die bei Kaninchen durch *Reserpin* verursachte Adrenalinverarmung der Nebennieren ausschließlich auf einer die Neubildung überschreitenden Mehrabgabe beruht, müßten die ins Nebennierenvenenblut sezernierten Adrenalinmengen zumindest dem Defizit in der verarmten Nebenniere entsprechen.

Wir haben an Kaninchen den Einfluß des Reserpins auf den Adrenalingehalt des Nebennieren-Venenblutes sowie die quantitativen Beziehungen zwischen Adrenalinsekretion und Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks untersucht.

Methodik

1. Gewinnung des Nebennierenvenenblutes. Ausgewachsene, meistens männliche Kaninchen wurden am Vorabend des Versuches nüchtern gesetzt. In Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.) wurde die Vena Cava inf. an der Einmündungsstelle der V. renalis sin. vom Peritoneum befreit und 3—5 mm cranial und caudal der Nierenvene je ein Faden um die Cava herumgelegt. In den meisten Fällen mündet der Hauptast der linken Nebennierenvene entweder direkt oder über eine von lateral kommende Lumbalvene in die V. renalis. Bei manchen Tieren gehen kleine Seitenäste an den Winkel, den V. Cava und die einmündende V. renalis bilden. In solchen Fällen muß der craniale Faden etwas höher gelegt werden, um ein Abklemmen der Nebennierenvenenäste zu vermeiden. Unter Anziehen der beiden Fadenschlingen und vorsichtigem Abpräparieren des Peritoneums läßt sich der nunmehr gestaute Cava-Abschnitt auch von dorsal übersehen, wo meistens zwei in die Cava oder renalis einmündende Venen erscheinen, die abgebunden werden. Zu beachten sind atypische Insertionen der V. spermatica sin. — Nach Freigeben des Cava-Durchflusses wird die linke Nierenvene freipräpariert und ein mit Heparin-Kochsalzlösung gefüllter Polyäthylenkatheter, der später seitlich durch die Bauchwand geführt wird, in die Vene eingebunden. Die A. renalis sin. sowie die regionale V. lumbalis lateral von der Nebenniere werden abgebunden. Darauf erhält das Tier 5000 E/kg Heparin.

Nach der Operation wird ein etwa 7 cm hoher Glaszylinder mit einem Durchmesser von 2,5 cm so über dem Operationsfeld befestigt, daß die Haltefäden der Cava nach oben hindurchgeführt und die Bauchdecken um den Zylinder herum verschlossen werden können. Dadurch bleibt das Operationsfeld frei von Darmschlingen, die Lage des Katheters und der Haltefäden kann jederzeit kontrolliert werden.

Zur Gewinnung des Nebennieren-Venenblutes werden die Haltefäden angezogen, so daß der Cava-Durchfluß unterbrochen wird. Um einen gleichmäßigen Fadenzug während der Blutabnahme zu garantieren, haben wir über dem Glaszylinder 2 Haken angebracht, an denen die Fäden befestigt wurden. Von dem aus dem geöffneten Katheter abtropfenden Blut wird 1 ml verworfen. Das entspricht dem Volumen des Katheters und der gestauten Venenabschnitte. Die folgenden 3 ml Blut werden sofort zentrifugiert, das Plasma wird eingefroren. Normalerweise werden zur Gewinnung von 3 ml Blut 5—8 min benötigt, nach Reserpin 6—13 min. Nach jeder Abnahme erhält das Tier 4 ml 6% ige sterile Gelatinelösung i.v.

2. Bestimmung des Adrenalingehaltes im Nebennierenvenen-Plasma. Die Kaninchennebenniere enthält nur Adrenalin (Holtz u. Schümann) und gibt

sowohl unter Ruhebedingungen als auch bei erhöhter Sekretion nur Adrenalin an das Nebennieren-Venenblut ab (siehe Versuchsteil). Den Adrenalingehalt des Plasmas haben wir am Katzenblutdruck und in einem Teil der Versuche fluorimetrisch bestimmt. Die mit beiden Methoden erhaltenen Werte stimmten überein.

a) Auswertung am Katzenblutdruck. Katzen in Pentobarbital-Narkose (40 bis 45 mg/kg s.c.) erhielten 1 Std vor Versuchsbeginn 1 mg/kg Atropinsulfat und 7 mg/kg Cocainhydrochlorid i.m., 30 min später 200 μg Hexamethoniumbromid i.v. Nach dieser Vorbehandlung wirkten 0,05—0,1 μg Adrenalin bei Registrierung des Blutdrucks mit einem einschenkligen Quecksilbermanometer deutlich blutdrucksteigernd. Für die Austestung genügten je 0,25—0,75 ml Plasma.

b) Fluorimetrische Bestimmung. 1,5—2 ml Plasma wurden mit 16 ml 0,4 n $HClO_4$ versetzt; nach dem Abzentrifugieren des Eiweißniederschlages und Zugabe von 1 ml n/1 HCl wurde mit K_2CO_3 bis p_H 5,5 anneutralisiert. Nach 30 min langem Stehen im Eisschrank wurde von dem ausgefallenen $KClO_4$ abzentrifugiert. Die klare wäßrige Lösung wurde im Vakuum bei 45° C zur Trockene gebracht und in 2 ml aqua. dest. aufgenommen. In dieser Lösung wurde der Adrenalingehalt fluorimetrisch nach v. Euler u. Floding bei p_H 6,0 bestimmt.

c) Berechnungen. Die Adrenalinsekretion wurde in μg/kg/min auf Adrenalinhydrochlorid berechnet.

3. Bestimmung des Adrenalingehaltes der Nebennieren. Nach der letzten Blutentnahme wurden beide Nebennieren exstirpiert und einzeln extrahiert (Kroneberg u. Schümann). Die Bestimmung des Adrenalingehaltes erfolgte *colorimetrisch* nach v. Euler u. Hamberg. Da in unseren vorangehenden Untersuchungen beide Nebennieren gemeinsam aufgearbeitet und der Adrenalingehalt in μg/kg Körpergewicht berechnet wurde, haben wir den in den jetzigen Versuchen für jede Nebenniere getrennt bestimmten Adrenalingehalt mit 2 multipliziert, um mit unseren früheren Werten vergleichen zu können. Nur in Tab. 3 ist der absolute Adrenalingehalt pro Nebenniere angegeben.

4. Verwendete Substanzen. Reserpin[1] als wasserlösliches Gemisch (1:10) mit Ascorbinsäure i.v. Entsprechende Mengen Ascorbinsäure in Kontrollversuchen. Suprareninhydrochlorid (Hoechst).

Versuche

1. Hormongehalt des Nebennierenvenenplasmas unter „Ruhebedingungen". Frühere Untersuchungen (Holtz u. Schümann; Holtz, Kroneberg u. Schümann 1950, 1951) hatten ergeben, daß die Kaninchennebenniere nur Adrenalin enthält, daß aber sympathisch innervierte Organe, z. B. das Herz auch bei Kaninchen überwiegend Noradrenalin enthalten.

Wir haben das unter „Ruhebedingungen" unserer Versuchsanordnung gewonnene Blut der linken Nebennierenvene am *Katzen*blutdruck und *Rattenuterus* auf Adrenalin und Noradrenalin untersucht (de Jalon, Bayo u. de Jalon; Holtz, Kroneberg u. Schümann 1951). Wie der in Abb. 1 wiedergegebene Versuch zeigt, sind am Katzenblutdruck 0,5 ml Plasma mit 0,35 μg Adrenalin und 0,15 μg Noradrenalin wirkungsgleich. 1 ml Plasma entsprechen demnach 0,7 μg Adrenalin. An dem gegenüber

[1] Der Fa. C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof, danken wir für die Überlassung.

Adrenalin empfindlicheren Rattenuterus ist ein Zehntel der am Katzenblutdruck mit 0,35 μg Adrenalin äquivalenten Plasmamenge — 0,05 ml — mit der ebenfalls zehnfach kleineren Adrenalindosis — 0,035 μg — wirkungsgleich. Da am Rattenuterus erst 4 μg Noradrenalin mit 0,035 μg Adrenalin äquivalent sind (Wirkungsverhältnis 1:114), müßte, wenn das Plasma nennenswerte Mengen Noradrenalin enthielte, die am Katzenblutdruck mit Adrenalin wirkungsgleiche Plasmadosis am Rattenuterus schwächer wirken als die entsprechende Adrenalindosis. Da sowohl am Katzenblutdruck als auch am Rattenuterus 1 ml Plasma so wirksam ist wie 0,7 μg Adrenalin, darf geschlossen werden, daß die Kaninchennebenniere nur Adrenalin sezerniert.

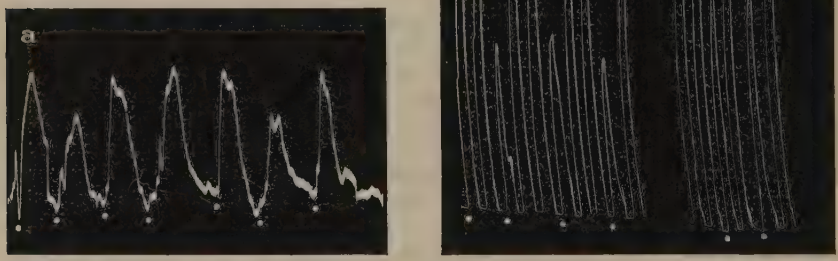


Abb. 1. *Biologische Austestung von Nebennierenvenenplasma an Blutdruck und Uterus. A* Adrenalin, *N* Noradrenalin, *P* Plasma, *Ac* Testdosis Acetylcholin. a Katzenblutdruck, b Rattenuterus. Ergebnis: An beiden Testobjekten entsprachen 1 ml Plasma 0,7 μg Adrenalin

Tabelle 1. „*Ruhesekretion*" *der linken Nebenniere bei Kaninchen und Adrenalingehalt der linken und rechten Nebenniere*

Vers. Nr.	Tier-Gew.	Adrenalinsekretion in μg/kg/min nach Stunden				Adrenalingehalt der Nebennieren nach letzter Blutentnahme in μg/kg*	
	kg	0	1	2	4	li. N.N.	re. N.N.
1	2,3	0,097	0,07	0,098	0,074	88	94
2	2,3	0,065	0,078	0,076	—	83	87
3	1,9	0,12	0,13	0,12	—	78	92

* Berechnung siehe Methodik.

In der Tab. 1 ist jeweils die zu Beginn des Versuchs (15 min nach Beendigung der Operation) und die nach 1—4 Std bestimmte (siehe

Methodik) „Ruhesekretion" der linken Nebenniere in μg/kg/min angegeben. Diese beträgt zu Versuchsbeginn (Zeit 0) 0,065—0,12 μg/kg/min. Kaindl u. v. Euler sowie v. Brücke, Kaindl, Kobinger, Kraupp u. Mayer haben im Nebennierenvenenblut von Katzen ähnliche Werte gefunden. Die „Ruhesekretion" bleibt auch bei mehrstündiger Versuchsdauer am gleichen Versuchstier ziemlich konstant. Der Adrenalingehalt der am Ende des Versuchs entnommenen Nebennieren entspricht dem in unseren früheren Versuchen ermittelten Durchschnittswert (86 μg/kg) (Kroneberg u. Schümann). Die unter „Ruhebedingungen" von den Nebennieren abgegebenen Adrenalinmengen führen demnach zu keiner Verminderung des Adrenalingehaltes. Die Neubildung hält Schritt mit der Abgabe.

2. Adrenalinsekretion des Nebennierenmarks 1—4 Std nach Reserpin. 1 Std nach der intravenösen Injektion von 4 mg/kg Reserpin waren die Adrenalinwerte im Plasma des Nebennierenvenenblutes in 6 von 8 Versuchen um das 2—3fache gegenüber der Norm erhöht (Tab. 2). Die Hypersekretion kann aber schon früher einsetzen. Das zeigt der Versuch Nr. 5, in dem die Sekretion 30 min nach Reserpin doppelt so hoch war wie die unbeeinflußte „Ruhesekretion". Mitunter findet man auch noch in dem nach 2 Std entnommenen Blut erhöhte Adrenalinwerte im Plasma, in der 3. und 4. Std jedoch meistens nicht mehr. In den Versuchen 3 und 4 war der Adrenalingehalt des Plasmas 3 Std nach Reserpin sogar deutlich niedriger als zu Beginn. — Das Sekretionsprodukt ist, wie die differenzierende Auswertung an Katzenblutdruck und Rattenuterus ergab, auch bei gesteigerter Hormonsekretion Adrenalin.

Setzt man die im Verlaufe des Versuchs sezernierten Adrenalinmengen in Beziehung zu dem am Ende des Versuchs in der Nebenniere gefundenen Adrenalingehalt, so ergibt sich Folgendes: Im Versuch Nr. 1 liegt der Adrenalingehalt der Nebenniere mit 77,5 μg/kg Körpergewicht im Bereich der Norm, obwohl die Sekretion nach Reserpin während der Versuchsdauer erhöht war. Auch im Versuch Nr. 3 hat die Nebenniere trotz vorangegangener 4stündiger Mehrsekretion noch einen Adrenalingehalt, der an der unteren Grenze der Norm liegt. Demgegenüber findet sich in den Versuchen Nr. 3, 4 und 5 trotz schwächerer und kürzer dauernder Sekretionssteigerung eine erhebliche Verarmung der Nebenniere an Adrenalin. In den Versuchen Nr. 7 und 8 schließlich ist der Adrenalingehalt der Nebennieren vermindert, obwohl Reserpin überhaupt nicht zu einer nachweisbaren Sekretionssteigerung geführt hatte.

Die durch Reserpin verursachte Adrenalinverarmung der Nebennieren kann deshalb nicht allein mit einer vermehrten, die Neubildung übersteigenden Abgabe erklärt werden.

Um die insgesamt sezernierten mit den zu Versuchsende in der Nebenniere noch vorhandenen Adrenalinmengen in Relation setzen zu können,

haben wir für einige Versuche die während der gesamten Versuchsdauer sezernierten Adrenalinmengen durch Interpolieren berechnet. In einem Koordinatensystem wurde auf der Ordinate die Sekretion in μg/kg/min, auf der Abszisse die Zeiten der Blutentnahme aufgetragen. Da die Kontrollversuche (Tab. 1) eine über mehrere Stunden konstante Ruhesekretion ergeben hatten, konnte diese in der graphischen Darstellung als

Tabelle 2. *Adrenalinsekretion der linken Nebenniere und Adrenalingehalt der linken und rechten Nebenniere nach 4 mg/kg Reserpin i.v.*
Der Plasmaadrenalingehalt wurde biologisch am Katzenblutdruck, nur im Versuch Nr. 7 fluorimetrisch bestimmt

Vers. Nr.	Tier-Gew. kg	Adrenalinsekretion in μg/kg/min						Adrenalingehalt der Nebennieren nach letzter Blutentnahme in μg/kg*	
		vor	nach Reserpin (Std)						
			1/2	1	2	3	4	li. N.N.	re. N.N.
1	2,1	0,06 0,063	—	0,135	0,105	—	—	77,5	77,5
2	2,1	0,075 0,080	—	0,22	0,15	0,195	0,092	60,7	53,8
3	2,1	0,082 0,10	—	0,18	—	0,07	—	25,8	21,5
4	2,4	0,10 0,10	—	0,21	0,08	0,04	—	31,3	29,7
5	2,0	0,068	0,13	0,11	0,063	—	—	11,3	12,6
6	2,0	0,071	—	0,25	0,20	0,06	—	45	37
7	2,0	0,072 0,084	—	0,083	—	—	—	41,3	35
8	2,0	0,07	—	0,07	—	—	—	18,7	18,7

* Berechnung siehe Methodik

eine von dem betreffenden Ordinatenwert (siehe Tab. 2 Spalte „Ruhesekretion") ausgehende Horizontale eingezeichnet werden. Die darüber liegende „Mehrsekretion" wurde unter Zugrundelegung der in Tab. 2 aufgeführten Werte kurvenmäßig dargestellt und als Flächenintegral berechnet. Die Addition der Ruhesekretion und Mehrsekretion ergab dann die Gesamtsekretion innerhalb der Versuchszeit. Da die Meßpunkte nur die zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehende Sekretion wiedergeben und die zwischenzeitlichen Schwankungen der Sekretion nicht erfaßt werden, entsprechen die errechneten Werte natürlich nur annähernd den tatsächlich sezernierten Mengen (Tab. 3).

Im Versuch Nr. 1 (Tab. 3) war der Adrenalingehalt der Nebenniere trotz einer über den Werten der Ruhesekretion liegenden Mehrsekretion von insgesamt 12,6 μg Adrenalin am Ende des Versuches normal (81 μg). Die gesteigerte Sekretion muß also durch eine gesteigerte Synthese

ausgeglichen worden sein. Während der doppelt so langen Versuchsdauer im Versuch Nr. 2 wurde nahezu 3mal mehr Adrenalin sezerniert als im Versuch Nr. 1. Auch hier muß die Resynthese mit der Hypersekretion Schritt gehalten haben, da der Adrenalingehalt der Nebenniere mit 63 μg noch im Bereich der Norm liegt. Im Versuch Nr. 6 ist die Adrenalinmehrabgabe nicht größer als im Versuch Nr. 2. Trotzdem verarmt die Nebenniere auf 45 μg, d. h. die in beiden Versuchen gleich hohe Mehrsekretion wird im einen Fall durch Resynthese kompensiert, im anderen nicht. Im Versuch Nr. 5 ist die Gesamtsekretion sogar kleiner als in den

Tabelle 3. *Adrenalinsekretion und Adrenalingehalt der linken Nebenniere.* Die wiedergegebenen Werte sind berechnet aus den entsprechenden Versuchen der Tab. 2. Berechnung und Erläuterung siehe Text

Vers. Nr.	Tier-Gewicht kg	Versuchs-dauer Std	Anteil der Ruhesekret. in μg	Mehr-sekretion in μg	Gesamt-sekretion in μg	Adrenalin-gehalt der linken N.N. in μg
1	2,1	2	15,5	12,6	28,1	81
2	2,1	4	39	40	79	63
5	2,0	2	16,4	8,2	24,6	11,3
6	2,0	3	25,6	36,6	62,2	45
7	2,0	1	9,4	1,8	11,2	41,3
8	2,0	1	9,8	—	9,8	18,7

vorangehenden Versuchen, so daß eine normale Resynthese eine Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks hätte verhüten müssen. Trotzdem enthält die Nebenniere nur 11,3 μg Adrenalin. Die Summe der insgesamt sezernierten und der noch in der Nebenniere vorhandenen Mengen ergibt mit 35,9 μg nicht einmal den normalen Gehalt, der bei 80 μg liegt. In den Versuchen 7 und 8, in denen 1 Std nach der Injektion von Reserpin die Sekretion nicht erhöht war, sind die Nebennieren trotzdem an Adrenalin verarmt. Die Summe: „sezerniertes Adrenalin + in der Drüse vorhandenes Adrenalin" ist kleiner als dem Normalgehalt entspricht.

Wenn die Gesamtsekretion auch nur durch Interpolieren berechnet wurde, so sprechen die Ergebnisse doch dafür, daß die nach Reserpin auftretende Hormonverarmung nicht allein durch ein Mißverhältnis zwischen Sekretion und Synthese verursacht sein kann.

3. Adrenalinsekretion und Adrenalingehalt der Nebennieren 5 und 20 Std nach Reserpin. Untersucht man die Adrenalinabgabe der Nebenniere nicht in stündlichen Abständen, sondern erst 5 Std nach der Injektion von Reserpin, so findet man die Höhe der Sekretion normal oder sogar etwas erhöht (Tab. 4), obwohl die Nebenniere zu diesem Zeitpunkt nur noch 10—30% des normalen Adrenalingehaltes besitzt.

Im Versuch 1 der Tab. 4 war die Adrenalinsekretion mit 0,066 μg/kg je Minute normal, obwohl die unmittelbar nach der Blutentnahme exstirpierte Nebenniere nur noch 7,6 μg/kg Körpergewicht enthielt. Trotz des stark verminderten, nur noch 10% der Norm betragenden Hormongehaltes kann also die Sekretion auf der normalen Höhe gehalten werden.

Tabelle 4. *Adrenalinsekretion der linken Nebenniere und Adrenalingehalt beider Nebennieren 5 und 20 Std nach 4 mg/kg Reserpin i.v.*
Der Plasmaadrenalingehalt wurde biologisch am Katzenblutdruck und nur in den Versuchen Nr. 1, 7 und 9 fluorimetrisch bestimmt

Vers. Nr.	Tiergewicht kg	Std nach Reserpin	Adrenalinsekretion in μg/kg/min	Adrenalingehalt d. Nebennieren nach letzter Blutabnahme in μg/kg*	
				li. N.N.	re. N.N.
1	1,9	$5^1/_2$ 6	0,05 0,066	7,6	7,6
2	2,3	5 $5^1/_2$	0,05 0,04	14,1	18,2
3	2,0	5 $5^1/_2$	0,12 0,13	32	28
4	2,0	5	0,157	20,9	21,6
5	2,1	20 $20^1/_2$	0,011 0,01	10,8	8,9
6	1,75	20 $20^1/_2$	0,063 0,054	15	19,3
7	2,2	20	0,036	5,1	3,4
8	1,9	20	0,047	13,8	9,9
9	2,0	20	0,028	3,6	1,8

* Berechnung siehe Methodik

20 Std nach der Injektion von Reserpin — der Adrenalingehalt der Nebenniere beträgt noch 5—17% der Norm — ist jedoch die Sekretion nur noch in einem von 5 Versuchen normal (Versuch Nr. 6), in 3 Versuchen (Nr. 7, 8 und 9) beträgt sie nur noch 30—50% der Norm. Der Adrenalingehalt der Nebennieren ist nach 20stündiger Versuchsdauer nicht wesentlich niedriger als nach 5stündiger; im ersten Fall beträgt er 10—30%, im zweiten 5—17% der Norm. Jedenfalls ist die Differenz geringer als diejenige zwischen den während einer 5stündigen und den während einer 20stündigen Versuchsdauer abgegebenen Adrenalinmengen. Während im 5 Std-Versuch die Sekretion möglicherweise noch aus dem zu Anfang im Nebennierenmark vorhandenen „Depot" gespeist werden könnte, war das bei dem 20 Std-Versuch wohl kaum möglich. Hier muß die Sekretion aus der Resynthese des Hormons stammen.

4. Die Bedeutung der Innervation für die Adrenalinsekretion und -synthese. Nach Durchschneidung des N. splanchnicus sinkt die Ruhesekretion der Nebenniere auf ein Drittel bis ein Fünftel der Normalwerte

Tabelle 5. *Der Einfluß der Splanchnicotomie auf die Adrenalinsekretion der linken Nebenniere.*
Der Plasmaadrenalingehalt wurde in den Versuchen 1—4 fluorimetrisch und in den Versuchen 5 und 6 biologisch am Katzenblutdruck bestimmt

Vers. Nr.	Tiergewicht kg	Adrenalinsekretion in µg/kg/min		Adrenalingehalt d. Nebennieren nach der letzten Blutabnahme in µg/kg*	
		Ruhesekretion	15 min nach Splanchnicotomie	li. N.N.	re. N.N.
1	2,2	0,06 0,06	0,013 0,009	68	65
2	2,35	0,03	0,006	80	61
3	1,9	0,19	0,059	75	73
4	1,9	0,11	0,038	—	—
5	2,1	—	0,005 0,007	57	59
6	2,1	—	0,01** 0,009 0,01 0,011	91	60

* Berechnung siehe Methodik ** Abnahmen in 30 min Abstand

Tabelle 6. *Der Einfluß der Splanchnicotomie auf die Adrenalinsekretion der linken Nebenniere 20 Std nach 4 mg/kg Reserpin i.v.*
Der Plasmaadrenalingehalt wurde in allen Versuchen fluorimetrisch bestimmt

Vers. Nr.	Tiergewicht kg	Adrenalinsekretion in µg/kg/min		Adrenalingehalt d. Nebennieren in µg/kg*	
		vor	nach		
		Splanchnicotomie		li. N.N.	re. N.N.
1	2,2	0,036	0,008 0,006	5,1	3,4
2	2,15	0,035	0,01	12,0	8,0
3	2,25	—	0,003	6,6	6,6
4	2,0	0,028	0,012	3,5	1,8

* Berechnung siehe Methodik

ab (Tab. 5). Das bedeutet, daß auch die Ruhesekretion unter den Bedingungen des Versuchs: Narkose, operative Eingriffe usw. zu 65 bis 80% von der Innervation durch den N. splanchnicus abhängt. Durchschneidet man den N. splanchnicus bei Kaninchen, die 20 Std vorher

4 mg/kg Reserpin erhalten haben und deren Nebennierenmark deshalb stark an Adrenalin verarmt ist, so nimmt auch jetzt die schon um 50% verminderte, nur aus der Synthese gespeiste Sekretion nochmals um 50—80% ab (Tab. 6). Auch diese steht also unter der Herrschaft des Splanchnicus.

Nach Splanchnicotomie wird die hierdurch verminderte Sekretion durch Reserpin nicht mehr erhöht, obwohl die denervierte Nebenniere ein beträchtliches Adrenalindepot besitzt (Tab. 7). Das steht im Einklang mit unseren früheren Versuchen (Kroneberg u. Schümann), in denen am nicht narkotisierten Tier die durch Splanchnicusdurchschneidung denervierte Nebenniere nach Reserpin weit weniger an Adrenalin verarmte als die innervierte.

Tabelle 7. *Adrenalinsekretion der linken Nebenniere nach Splanchnicotomie und 4 mg/kg Reserpin i.v.*

Der Plasmaadrenalingehalt wurde in Versuch Nr. 1 fluorimetrisch, im Versuch Nr. 2 biologisch am Katzenblutdruck bestimmt

Vers. Nr.	Tier-Gew. kg	Adrenalinsekretion in µg/kg/min			Adrenalingehalt der Nebennieren in µg/kg*	
		Ruhe-sekretion	15 min nach Splanch-nicotomie	1 Std nach Reserpin	li. N.N.	re. N.N.
1	1,9	0,102	0,038	0,036	51	58
2	2,0	0,080	0,012	0,0115	50	54

* Berechnung siehe Methodik

5. Der Einfluß von Iproniacid auf die zur Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks führende Reserpinwirkung. Die Hormonverarmung des Nebennierenmarks durch Reserpin kann nicht allein durch eine die Resynthese überschreitende Hypersekretion verursacht sein, denn die sezernierten Mengen sind geringer als der Abnahme des Adrenalingehaltes der Nebennieren entspricht. Die Ursache kann auch nicht allein eine etwa durch Reserpin bedingte Hemmung der Adrenalinsynthese sein, denn die Abnahme des Adrenalingehaltes der Nebennieren ist größer als die sezernierten Mengen. Die nächstliegende Erklärung wäre, daß das Defizit durch einen vermehrten Abbau von Adrenalin im Nebennierenmark zustande kommt: mit anderen Worten, daß die unter der Reserpinwirkung erfolgende Verarmung des Nebennierenmarks an Adrenalin zum Teil durch eine „Freisetzung" des Hormons erfolgt, die dieses dem Abbau durch die Monoaminoxydase zugänglich macht. Hemmung der Monoaminoxydase durch Iproniacid müßte deshalb ähnlich wie in den Versuchen von Holtz, Balzer u. Westermann an *Ratten*, so auch bei *Kaninchen* die nach Reserpin auftretende Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks wenigstens etwas vermindern. Die

Versuche der Tab. 8 zeigen, daß der Adrenalingehalt der Nebennieren bei den Kontrolltieren und den mit Iproniacid behandelten Tieren im Mittel nahezu gleich groß ist. 16 Std nach der intravenösen Injektion von 5 mg/kg Reserpin ist der Adrenalingehalt bei den Kontrolltieren im Mittel auf ein Zehntel (8 μg/kg) reduziert. Ein Tier starb während des Versuches. Vorbehandlung mit Iproniacid (100 mg/kg 6 Std vor Reserpin) hemmt nur bei 3 von 4 Tieren, denen die hohe Dosis Reserpin (5 mg/kg) injiziert worden war, die Hormonverarmung. Die „Iproniacidtiere" haben im Durchschnitt noch 29 μg/kg Adrenalin in den Nebennieren — gegenüber 80 μg/kg normal —, die Kontrolltiere, die nur Reserpin erhalten hatten, nur noch 8 μg/kg Körpergewicht. Im Gegensatz hierzu schützte die Vorbehandlung mit Iproniacid nicht vor der nach der kleineren

Tabelle 8. *Adrenalingehalt der Kaninchennebennieren in μg/kg nach Reserpin und Iproniacid.*

Kaninchen 1,7—2,3 kg. — Iproniacid-Vorbehandlung (100 mg/kg) 6 Std vor Reserpin. 16 Std nach Reserpin wurden die Nebennieren untersucht. Die Kontrollen erhielten Ascorbinsäure in entsprechender Menge

Vers. Nr.	Kontrollen	Iproniacid	Reserpin 5 mg/kg	Reserpin 5 mg/kg + Iproniacid	Reserpin 0,5 mg/kg	Reserpin 0,5 mg/kg + Iproniacid
1	87	67	†	38	31	30
2	72	88	12	28	31	31
3	63	83	7	41	34	53
4	114	80	7	8	32	37
Mittel	84	80	8	29	32	38

Reserpindosis (0,5 mg/kg) auftretenden, geringeren Adrenalinverarmung. Kontrolltiere und Iproniacidtiere enthielten 32 bzw. 38 μg/kg Körpergewicht Adrenalin im Nebennierenmark (siehe Tab. 8).

Diskussion

Der Nachweis, daß Reserpin bei Kaninchen die Adrenalinabgabe aus dem Nebennierenmark erhöht, führt zu der Frage, ob die *Hypersekretion* die Ursache der Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks ist.

In einigen Versuchen kam es trotz vermehrter Sekretion zu keiner Verarmung; in anderen war die Adrenalinverarmung stärker als den sezernierten Adrenalinmengen entsprach.

Die Diskrepanz zwischen sezernierter Adrenalinmenge und Adrenalinverlust des Nebennierenmarks bleibt auch dann bestehen, wenn man berücksichtigt, daß — wie eigene Versuche ergaben — nur 75—80% des Adrenalingehaltes des Vollblutes im Plasma vorkommen — in dem wir den Adrenalingehalt bestimmten —, die restlichen 20—25% jedoch in den Formelementen. Die prozentuale Verteilung des

Adrenalins auf Plasma und Formelemente erfährt auch bei der durch Reserpin erhöhten Sekretion keine Änderung.

Die Differenz zwischen den während der Versuchsdauer insgesamt sezernierten Adrenalinmengen und der Verarmung des Nebennierenmarks macht es unwahrscheinlich, daß eine die Resynthese übersteigende Mehrsekretion die einzige Ursache ist. Die Adrenalinverarmung der Nebennieren kann nicht allein durch eine *Hypersekretion*, auch nicht durch eine Hemmung der Synthese verursacht sein: Adrenalinverlust des Nebennierenmarks und sezernierte Adrenalinmengen müßten sonst annähernd gleich sein. Es muß deshalb unter der Reserpinwirkung zusätzlich zu einer Zerstörung von Adrenalin im Nebennierenmark kommen. Dafür spricht auch, daß die nach großen Reserpindosen (5 mg/kg) auftretende Adrenalinverarmung der Nebennieren sich durch Hemmung der Monoaminoxydase mit Iproniacid wenn auch nicht verhindern, so doch einschränken ließ.

An der durch Reserpin verursachten Hormonverarmung des Nebennierenmarks sind demnach bei *Kaninchen* 2 Mechanismen beteiligt: 1. ein *zentral-nervaler*, der via Splanchnicus zu einer erhöhten Sekretion von Adrenalin aus den Nebennieren führt, 2. ein *peripherer*, der Adrenalin im Nebennierenmark „freisetzt" und es damit der Zerstörung durch die Aminoxydase preisgibt. Wichtiger und wirksamer ist der zentralnervale Mechanismus, denn nach völliger Denervierung der Nebennieren — Rückenmarkdurchtrennung in Höhe von C_6 — führt Reserpin zu keiner Verarmung mehr. Der periphere Mechanismus ist für Kaninchen nicht nur der weniger wichtige, sondern auch der weniger empfindliche, denn die „Freisetzung" von Adrenalin wird offenbar erst durch große Reserpindosen ausgelöst, da nur die durch große Reserpindosen, nicht aber die durch kleine Dosen herbeigeführte Verarmung durch Iproniacid hemmbar ist. Bei *Ratten* verursachen kleine Reserpindosen überhaupt keine nachweisbare Adrenalinverarmung der Nebennieren, und die nach großen Dosen (10 mg/kg) zustande kommende Abnahme des Adrenalingehaltes läßt sich durch Iproniacidvorbehandlung verhindern (Holtz, Balzer u. Westermann). Sie beruht demnach auf einer peripheren „Freisetzung" mit anschließendem Abbau durch die Monoaminoxydase und läßt sich durch Denervierung der Nebennieren nicht verhindern (Kroneberg u. Schümann 1957).

Offen bleibt, ob auch die *Adrenalinsynthese* durch Reserpin beeinträchtigt wird, denn die Ruhesekretion der fast völlig an Adrenalin verarmten Nebenniere, die praktisch nur durch Neubildung von Hormon gespeist sein konnte, betrug immer noch 50% der Norm. Andererseits kann offenbar die in manchen Versuchen schon nach kurzer Zeit extreme Verarmung der Nebennieren an Adrenalin weder durch Mehrsekretion, noch durch Adrenalinzerstörung erklärt werden, da die Hypersekretion

gering war und auch der durch Iproniacid hemmbare Anteil der Verarmung diese nicht aufwog.

Auffallend ist jedenfalls der Unterschied zwischen dem Einfluß des Reserpins und der elektrischen Splanchnicusreizung auf den Adrenalingehalt der Nebennieren. Im letzteren Fall wird, wie schon gesagt, die erhöhte Sekretion durch eine entsprechend erhöhte Synthese kompensiert. Bei der durch Reserpin verursachten Hormonverarmung scheint das nicht der Fall zu sein.

Summary

1. In rabbits under urethane anesthesia, the adrenaline content of the plasma collected from the left adrenal vein indicated a resting secretion of 0,065—0,13 μg adrenaline/kg/min. There was no evidence for an admixture of noradrenaline.

2. In most experiments $^1/_2$ to 4 hours after intravenous injection of 4 mg/kg *Reserpine*, the adrenaline content of the plasma was found to be 2 to 3 times higher than under normal conditions. After splanchnicotomy Reserpine did not increase the adrenaline content of the plasma.

3. 20 hours after Reserpine (4 mg/kg) the adrenaline stores of the adrenal medulla were almost completely depleted, whereas the adrenaline secretion was found to be reduced only to about 50% of its original value.

4. There was no relationship between the degree of depletion of the adrenal medulla and the amount of adrenaline secreted. In some experiments the adrenaline stores were depleted although the enhancement of the adrenaline secretion was only small and of short duration. It is concluded that the increase of the adrenaline secretion can not be the only reason for the depletion of the adrenal medulla.

5. Pretreatment with *Iproniacid* somewhat reduced the disappearence of adrenaline from the suprarenal gland caused by Reserpine (5 mg/kg). This suggests that after large doses of Reserpine, part of the adrenaline may be destroyed by monoaminoxydase within the suprarenal medulla.

6. The possibility is discussed that an inhibition of the synthesis of adrenaline might contribute to the depletion by Reserpine of the adrenaline stores in the suprarenal medulla.

Literatur

Brücke, F., F. Kaindl, W. Kobinger, O. Kraupp u. H. Mayer: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 169 (1953).

Elliot, T. R.: J. Physiol. (Lond.) **44**, 374 (1912).

Euler, U. S. v., and J. Floding: Acta physiol. scand. **33**, Suppl. **118**, 45 (1955).

Euler, U. S. v., and U. Hamberg: Acta physiol. scand. **19**, 74 (1949).

Hökfelt, B., and J. M. McLean: Acta physiol. scand. **21**, 258 (1950).

Holland, W. C., and H. J. Schümann: Brit. J. Pharmacol. **11**, 449 (1956).

Holtz, P., H. Balzer u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 361 (1957).
Holtz, P., G. Kroneberg u. H. J. Schümann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **209**, 364 (1950).
Holtz, P., G. Kroneberg u. H. J. Schümann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **212**, 551 (1951).
Holtz, P., u. H. J. Schümann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **210**, 1 (1950).
De Jalon, P. G., J. B. Bayo u. M. G. de Jalon: Farmacoter. act. **2**, 313 (1945).
Kaindl, F., and U. S. v. Euler: Amer. J. Physiol. **166**, 284 (1951).
Kroneberg, G., u. H. J. Schümann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 349 (1957).
Tscheboksaroff, M.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **137**, 59 (1910—1911).

Prof. Dr. H. J. Schümann und Priv.-Doz. Dr. G. Kroneberg,
Pharmakol. Inst. der Univ., Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 14

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmakol., Bd. 234, S. 147—163 (1958)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Arbeitsbereich Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lohmann)

Ein neues Verfahren für die quantitative Bestimmung von Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen mit m-Dinitrobenzol*

Von
Kurt Repke

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. März 1958)

Für Untersuchungen über den Verbleib von Digitoxigenin im Organismus wurde ein empfindliches und zu Serienbestimmungen geeignetes Nachweisverfahren benötigt, welches den Laktonring erfassen sollte. Unter den entsprechenden colorimetrischen Methoden für die Bestimmung von Cardenolid-Verbindungen (Übersichten von Bellet; Canbäck [1]; Stoll u. Jucker) schien die von Marthoud sowie Raymond eingeführte m-Dinitrobenzol-Reaktion noch am geeignetsten. Ihr Hauptmangel ist die große Labilität der entstehenden Farbsalze (vgl. Abb. 1). Eine ausreichend stabile Farbe ohne gleichzeitigen beträchtlichen Verlust an Empfindlichkeit wurde bei keiner der vorgeschlagenen Modifikationen erzielt (Anderson u. Chen; Banes; Canbäck [3]; Hassall u. Lippman; Kedde; Mesnard u. Lafargue; Pratt; Tattje; U.S.P. XIV).

Die m-Dinitrobenzol-Reaktion wurde bisher immer in Äthanol ausgeführt. Von Canbäck [2] sowie von Pratt wurden zwar andere Lösungsmittel, darunter auch Pyridin, geprüft, jedoch ist letzten Endes Äthanol für das geeignetste Medium gehalten worden. Nun haben kürzlich Wendland u. Lohmann gefunden, daß in Pyridin die Farbsalze des m-Dinitrobenzols mit gewissen Ketosteroiden auffallend beständig sind. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß in Pyridin auch die entsprechenden Farbsalze von Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen eine hohe Stabilität besitzen. Mit dem neuen Verfahren ist nunmehr die bequeme Meßbarkeit der optischen Dichte und die Reproduzierbarkeit des Meßwerts bei diesen Substanzen gewährleistet.

Zur Prüfung einer etwaigen Differenzierungsmöglichkeit zwischen den einzelnen Verbindungstypen werden eine größere Anzahl von Vertretern auf die Geschwindigkeit der Farbsalz-Bildung und die Absorptionsspektren hin untersucht. Die Leistungsfähigkeit der vorzuschlagenden

* Untersuchungen mit Herzsteroiden, 3. Mitteilung.

Methodik wird an Hand eines Vergleichs mit der Pikrinsäure-Reaktion (Baljet) und der Xanthydrol-Reaktion (Pesez [2]) demonstriert. Die neue Methodik erweist sich als die weitaus empfindlichste unter den Verfahren, die auf der Reaktion von Polynitro-Verbindungen mit aktiven Methylengruppen basieren oder sonst den Butenolid-Ring der Cardenolide nachweisen.

Methoden und Materialien

Steroide. allo-Cymarin stellte liebenswürdigerweise Herr Prof. Neumann-Würzburg zur Verfügung. Die kürzlich beschriebenen Digitanol-Glykoside Digifolein, Lanafolein, Digipurpurin und Digipronin (Tschesche et al. [2—4]) verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Prof. Tschesche-Hamburg. Diginin erhielt ich über Herrn Dr. J. Renz von Herrn Priv.-Doz. Dr. Tamm-Basel. Weitere Verbindungen verdanke ich der Großzügigkeit der Firmen C. F. Boehringer-Mannheim (Digoxin, Gitaloxin, Gitoxin, Strophanthidin, iso-Strophanthidin) und Sandoz-Basel (Lanatoside A, B, C; k-Strophanthosid, Scillaren A) sowie Merck-Darmstadt (Digitoxin, Digitoxigenin). Sämtliche Steroide wurden papierchromatographisch mit den von Kaiser beschriebenen Lösungsmittel-Systemen auf Einheitlichkeit geprüft. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tab. 2 angemerkt. Im Hinblick auf die Feststellung von Demoen u. Janssen, daß sich der Butenolid-Ring bei der Trocknung mit höheren Temperaturen zersetzen kann, wurden die Substanzen zumeist nur durch wochenlange Aufbewahrung im Vakuumexsiccator über $CaCl_2$ bei Zimmertemperatur getrocknet. Allein die hygroskopischen Lanatoside wurden auf 105° C unter den von Hazard et al. angegebenen Bedingungen erhitzt. k-Strophanthosid wurde im Pumpenvakuum bei 80° C über P_2O_5 getrocknet. Bei der Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten wurde ein etwaiger Lösungsmittel- oder Wassergehalt der Steroide nicht berücksichtigt.

Reagentien. Die Reinigung von m-Dinitrobenzol und Pyridin wurde nach den Angaben von Wendland u. Lohmann vorgenommen. Trinitrophenol war aus Äthanol umkristallisiert. Beim Xanthydrol handelte es sich um ein handelsübliches Präparat mit einem Schmelzpunkt von 124° C (korr.).

Colorimetrische Methoden. Bei einer Prüfung verschiedener Modifikationen (Bell u. Krantz [3]; Neuwald [1]; U.S.P. XIV) der von Baljet angegebenen Pikrinsäure-Reaktion wurden die höchsten Farbwerte mit der von Neuwald [1] empfohlenen Zusammensetzung des Reagenses erhalten, der daraufhin der Vorzug gegeben wurde. — Die Xanthydrol-Reaktion wurde nach den Angaben von Pesez [2] ausgeführt.

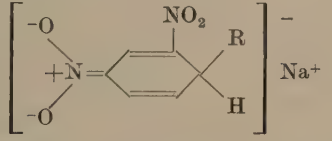
Spektrophotometrie. Die Absorptionsspektren wurden mit einem automatisch registrierenden Spektralphotometer (Typ SF-2M, UdSSR) aufgenommen, das kontinuierlich schrieb. Die Meßdauer betrug für einen Bereich von 300 mμ etwa 7 min. Die Einzelmessungen wurden bei der Pikrinsäure-Reaktion am Universal-Spektrophotometer von Zeiß-Jena, bei der m-Dinitrobenzol-Methode am Spiegel-Doppelmonochromator nach Neubauer ausgeführt. Die Serienbestimmungen wurden bei der m-Dinitrobenzol- und der Xanthydrol-Reaktion mit Hilfe der schon früher beschriebenen Meßanordnung vorgenommen.

Ergebnisse

Die Reaktion zwischen m-Dinitrobenzol und aktiven Methylenverbindungen in alkalischem Alkohol ist von Zimmermann und von Canbäck [2, 3] formuliert worden. Danach handelt es sich um die Bildung

eines gefärbten Komplexions zwischen dem teilweise positiv geladenen m-Dinitrobenzol-Kern und dem Anion der Methylenverbindung. Bei der Ausführung der Reaktion in Pyridin statt Äthanol wird nun nach Zusatz von Alkali schon bei Abwesenheit von aktiven Methylenverbindungen ein Farbsalz gebildet. Wie LOHMANN u. Mitarb. (LISZ; VENCKER; WENDLAND) gezeigt haben, liegt dieser Farbreaktion eine Komplexbildung mit dem Hydroxylion zugrunde.

Reaktionen in Pyridin:



R = Carbanion : blaues Farbsalz (λ_{max} bei 575 mμ)
R = OH : rotes Farbsalz (λ_{max} bei 535 mμ)

Während die Bildung des roten Farbsalzes fast momentan beendet ist, hängt die Bildungsgeschwindigkeit des blauen von der jeweiligen Dissoziationsbereitschaft der aktiven Methylenverbindung ab. In jedem Fall liegen am Ende der Reaktion ein rotes und ein blaues Farbsalz nebeneinander vor, deren Spektren sich teilweise überlagern (vgl. Abb. 3). Wie WENDLAND u. LOHMANN gefunden haben, ist das die Messungen störende, rote Alkali-Farbsalz im Gegensatz zum blauen Methylen-Farbsalz labil gegenüber Säuren. Vor der Bestimmung der optischen Dichte wird daher von ihnen die Auslöschung der roten Farbe durch schwache Säuren wie Borsäure oder Kohlensäure empfohlen.

I. Faktoren, welche Bildung und Beständigkeit der Farbsalze beeinflussen. Diese Faktoren sind für einige Ketosteroide von WENDLAND u. LOHMANN und für Aceton von VENCKER untersucht worden. Da sich die Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen zumeist als weitaus reaktionsfähiger und labiler erwiesen, mußten diese Faktoren neuerlich eingehend geprüft werden. Die gefundenen, optimalen Verhältnisse für eine praktikable Methodik haben in bezug auf den Wassergehalt des Pyridins, die Konzentration an m-Dinitrobenzol und die Reaktionstemperatur in den Standardbedingungen (siehe unten) ihren Niederschlag gefunden. Darüber hinaus sind für die Handhabung der Methodik noch folgende Beobachtungen wichtig.

Alkali-Effekte. Die Cardenolide verloren in pyridinischer Lösung schon nach Einwirkung sehr geringer Alkalikonzentrationen ihre Fähigkeit zur Bildung eines Farbsalzes mit m-Dinitrobenzol (vgl. Tab. 1). Aus dem Verhalten der allo- und iso-Verbindungen war zu schließen, daß diesem Verlust der Reaktionsfähigkeit nicht eine Isomerisierung, sondern die hydrolytische Spaltung des Lakton-Ringes zur Hydroxy- oder Aldehydsäure

Tabelle 1. *Der Einfluß einer Alkali-Vorbehandlung auf die Fähigkeit von Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen mit m-Dinitrobenzol Farbsalze zu bilden*
$1 \cdot 10^{-7}$ Mol der jeweiligen Verbindung, in 1 ml Pyridin gelöst, wurden mit 0,1 ml einer $n/_{20}$ wäßrigen NaOH-Lösung ($1 \cdot 10^{-5}$ Mol) versetzt und nach Mischung sowie entsprechend langer Aufbewahrung bei 25° C die Farbentwicklung durch Zugabe von 1 ml einer 10%igen m-Dinitrobenzol-Lösung in Pyridin ausgeführt.
$\varepsilon_{max} = \log i_0/i$ [cm²/Mol] bei t_{max} und λ_{max}

Verbindung	Werte für ε_{max} nach verschiedener Dauer (Minuten) der Alkali-Vorbehandlung			
	0	1	10	60
Digitoxin	29500	27300	14600	3200
Gitoxin	24400	19100	4000	1600
allo-Cymarin	25700	20100	4000	1100
iso-Strophanthidin	20800	14900	6400	1000
Diginin	37300	34400	30400	20100

zugrunde lag (vgl. auch Canbäck [3]). Während sich also die freien Verbindungen als sehr alkaliempfindlich herausstellten, erwiesen sich die gleichen Substanzen in ihren Farbsalzen zum Teil sogar als überraschend stabil gegenüber fortgesetzter Alkalieinwirkung (vgl. Abb. 1). Um eine maximale Farbentwicklung zu erhalten, mußten demnach Alkalien in der Stärke einwirken, welche gerade die Lakton-Verseifung ausschaltete, dagegen die Farbsalz-Bildung noch voll gewährleistete. Von den untersuchten Alkalien (darunter Salicylat-Puffer vom p_H 11,2 und Tetraäthylammoniumhydroxyd) eignete sich am besten verdünnte Natronlauge.

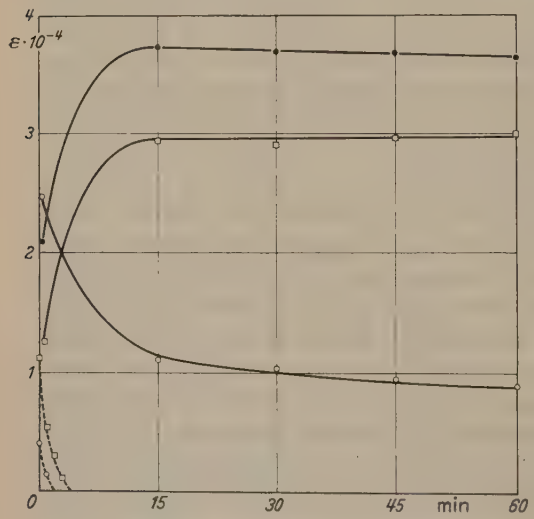


Abb. 1. *Entwicklung und Beständigkeit von Farbsalzen des m-Dinitrobenzols bei Gegenwart von Natronlauge:* Diginin •——•, Digitoxin □——□ und Gitoxin ○——○. Ausgezogene Kurven: in Pyridin. Gestrichelte Kurven: in Äthanol (Methodik nach Canbäck [3]). — ε = $\log i_0/i$ [cm²/Mol]

Säurewirkungen. Wie schon begründet wurde, war vor der Messung der optischen Dichte den Testlösungen eine schwache Säure zwecks Zersetzung des roten Alkali-Farbsalzes zuzusetzen. Die früher empfohlene Verwendung eines Borsäure-Kristalls wurde verlassen,

nachdem sich auch einige blaue Farbsalze der untersuchten Steroide als säureempfindlich herausgestellt hatten. Statt dessen wurde jetzt die Menge einer pyridinischen Borsäure-Lösung zugesetzt, die gerade zur Auslöschung der roten, durch Alkali erzeugten Farbe ausreichte. Unter diesen kontrollierten Bedingungen erwiesen sich innerhalb der ersten 5 min nach Säurezusatz als vollkommen stabil die Farbsalze der $C_{14}OH$-Verbindungen und von allo-Cymarin, Strophanthidin, iso-Strophanthidin sowie als praktisch stabil die Farbsalze der $C_{12,14}OH$-Verbindungen und von Digipurpurin. Bei den $C_{14,16}OH$-Verbindungen sowie den anderen Digitanolen zeigte sich dagegen die Beständigkeit der Farbsalze als geringer und war zur Erreichung reproduzierbarer Werte die Messung innerhalb der 1. min nach Säurezusatz notwendig (vgl. auch Abb. 2).

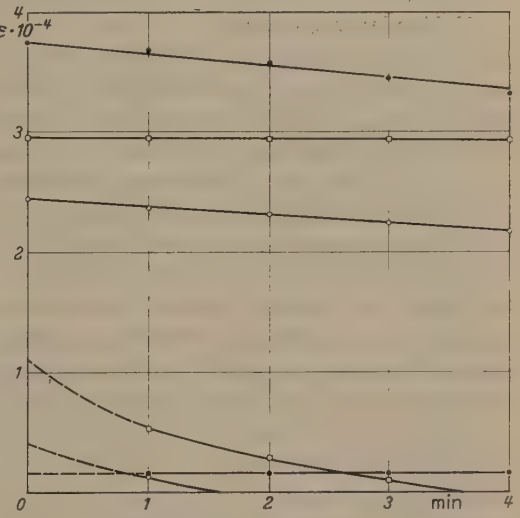


Abb. 2. *Beständigkeit der Farbsalze des m-Dinitrobenzols in Pyridin nach Borsäure-Zusatz* (obere Kurvenschar), dargestellt an Diginin •——•, Digitoxin □——□ und Gitoxin ○——○. Die untere Kurvenschar zeigt das Verhalten der gleichen Farbsalze in Äthanol

Störfaktoren. Spuren von Chloroform erwiesen sich als fähig, nach vorübergehender Bildung einer blauen Farbe das gesamte gebidete Farbsalz zu zersetzen. Wenn Chloroform für die Lösung der Steroide benutzt worden war, wurden daher die letzten Reste davon im Pumpenvakuum vertrieben. — Als wesentliche Störquelle für die Farbentwicklung erwies sich die Anwesenheit von alkaliverbrauchenden Substanzen in der Testlösung[1]. Infolge der geringen Löslichkeit der Natronlauge in Pyridin (vgl. VENCKER) ließ sich diese Störung nämlich nicht beliebig durch einen Mehrzusatz an dieser Lauge überwinden. Entsprechende Störungen ließen sich durch folgende Maßnahmen vermeiden. Die zu benutzenden Glassachen wurden nach Reinigung im Chromschwefelsäure-Bad gründlich gespült und gewässert. Auf Grund der Beobachtung, daß eine pyridinische m-Dinitrobenzol-Lösung bei tagelanger Aufbewahrung (—15° C) zunehmend mehr Alkali für eine reguläre Farbentwicklung verbrauchte, wurde die Lösung täglich frisch angesetzt.

[1] Störungen durch Säure-Äquivalente werden auch bei den anderen Methoden beobachtet, welche Polynitro-Verbindungen als Reagentien benutzen.

Schließlich wurden bei der Bestimmung von Cardenoliden in Geweben und Ausscheidungen die Extrakte soweit gereinigt, daß eine Störung durch Säure-Äquivalente ausgeschlossen war. Die Erfahrung lehrte, daß bei Auftreten einer kräftigen roten Farbe nach Zusatz von Natronlauge zur pyridinischen m-Dinitrobenzol-Lösung eine normale Entwicklung des blauen Farbsalzes mit aktiven Methylenverbindungen gewährleistet war. Das rote Alkali-Farbsalz stellte also einen geschätzten Indicator für eine ausreichende und gleichmäßige Basizität in den Testansätzen dar.

II. Standardbedingungen. Für die Ermittlung der Reaktionskinetik und der molaren Extinktionskoeffizienten wurden folgende, als optimal erkannte Bedingungen eingehalten. Das benutzte Reagens bestand aus einer 5 %igen Lösung von m-Dinitrobenzol in trockenem Pyridin, die im Verhältnis 20 : 1 mit n/20 wäßriger NaOH versetzt war. 0,010 ml einer pyridinischen Lösung der jeweiligen Verbindung wurden in ein 5 ml-Reagensglas mit Schliff oder in eine 2 ml-Cuvette pipettiert. Aus einer Eichpipette flossen dazu 2,00 ml Reagens, dann wurde umgeschüttelt. Nach Erreichen der maximalen Farbentwicklung bei 25° C (vgl. Tab. 2) wurde die Reaktion durch Zumischen von 0,05 ml einer n/5 pyridinischen Borsäure-Lösung unterbrochen und anschließend die Messung gegen das in gleicher Weise behandelte Reagens ausgeführt. Als Reaktionszeit wurde der Beginn des Zufließens des Reagenses bis zum Zumischen der Borsäure-Lösung gerechnet.

Bei den C_{14}OH- und $C_{12,14}$OH-Verbindungen erwies es sich als möglich ohne wesentlichen Verlust an Empfindlichkeit die Entwicklungszeit für die Farbsalze von 10—15 min auf 5 min durch folgende Modifikation zu verkürzen. Unter sonst unveränderten Bedingungen wurden die Steroide nur nacheinander mit 2,00 ml einer 0,5 %igen pyridinischen m-Dinitrobenzol-Lösung und 0,1 ml n/20 wäßriger NaOH versetzt. Diese Serienmodifikation zeigte gegenüber den Standardbedingungen den Vorteil einer höheren Spezifität (vgl. auch Tab. 3), allerdings war die Beständigkeit der Farbsalze gegenüber Lauge und Säure geringer.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war bei allen untersuchten Verbindungen gut. Bei den $C_{14,16}$ OH-Derivaten war dazu allerdings die Einhaltung der Standardzeiten Voraussetzung, d. h. etwaige Zeitüberschreitungen durften nicht mehr als 1 min betragen. Bei allen übrigen Verbindungen konnten jedoch die angegebenen Zeiten für die Farbentwicklung (vgl. Tab. 2) auch beträchtlich (bis zu 1 Std) ohne Gefährdung des Meßergebnisses überschritten werden (vgl. auch Abb. 1). — Das Lambert-Beersche Gesetz war auch dann noch erfüllt, wenn statt eines Spektralphotometers die früher angegebene Meßanordnung mit Metallinterferenz-Filter 579 mμ benutzt wurde (vgl. Abb. 2 bei Repke). Als untere Erfassungsgrenze können bei der angegebenen Ausführungsform $5 \cdot 10^{-10}$ Mol der jeweiligen Verbindung angesehen werden, was beispielsweise 0,2 μg Digitoxigenin entspricht.

Tabelle 2

Charakterisierung von 17 Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen durch ihre Farbsalze mit m-Dinitrobenzol, Pikrinsäure oder Xanthydrol

Verbindung	Stellung der OH-Gruppen	m-Dinitrobenzol			Pikrinsäure		Xanthydrol		Verhältnis der ε_{max}-Werte
		λ_{max} mμ	t_{max} min	ε_{max} [cm²/Mol]	t_{max} min	ε_{max} [cm²/Mol]	λ_{max} mμ	ε_{max} [cm²/Mol]	
Lanatosid A[1]	C_{14} (β)	556—572	15	29900	20	17200	534—546	33500	100:57:112
Digitoxin[1]	C_{14} (β)	562—580	15	29500	20	16700	534—546	49600	100:56:168
Digitoxigenin[1]	$C_{3,14}$ (β)	564—580	10	27000	20	16300	—	∅	100:60: 0
Lanatosid B[1]	$C_{14,16}$ (β)	570—580	0,7	24400	40	14800	534—546	33000	100:61:135
Gitoxin[1]	$C_{14,16}$ (β)	570—580	0,7	24400	50	16700	534—548	48200	100:68:197
Gitaloxin[1]	$C_{14,16}$ (β)*	566—580	0,7	24700	50	16200	534—546	47600	100:66:193
Lanatosid C[2]	$C_{12,14}$ (β)	572—584	10	29000	40	16900	532—548	33600	100:58:116
Digoxin[3]	$C_{12,14}$ (β)	570—582	10	28200	20	16200	532—548	47400	100:58:168
k-Strophanthosid[1]	$C_{5,14}$ (β)	554—588	10	26600	20	17000	—	1000	100:64: 4
allo-Cymarin[4]	$C_{5,14}$ (β)	562—576	10	25700	10	16200	530—544	15200	100:63: 58
k-Strophanthidin[4]	$C_{3,5,14}$ (β)	568—582	10	25700	20	17200	—	∅	100:67: 0
iso-Strophanthidin[1]	$C_{3,5}$ (β)	558—578	60	20800	—	∅	—	∅	100: 0: 0
Diginin[5]	—	566—586	15	37300	20	6700	530—544	16300	100:18: 44
Lanafolein[1]	C_2 (β)	560—572	15	37900	20	5700	530—546	15300	100:15: 40
Digifolein[1]	C_2 (α)	560—576	15	37500	20	6000	532—544	15500	100:16: 41
Digipurpurin[1]	?	570—580	10	26600	40	820	534—548	48200	100: 3:181
Digipronin[1]	?	556—572	0,7	28800	—	—	—	400	—
Scillaren A[1]	C_{14} (β)	—	—	∅	—	∅	—	400	—

Reinheitsgrad der untersuchten Verbindungen nach papierchromatographischen Analysen. [1] Einheitlich. — [2] Mit wenigen Prozent einer stärker polaren Substanz, vermutlich Lanatosid D. — [3] Mit wenigen Prozent einer stärker polaren Substanz, vermutlich Diginatin. — [4] Mit 3 nicht identifizierten, stärker polaren Komponenten, insgesamt einige Prozent ausmachend. — [5] Mit etwa 15% Digifolein. — * C_{16}OH formyliert.

III. Versuche über eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den einzelnen Verbindungen. Im Gegensatz zu anderen Methoden, welche auch aktive Methylenverbindungen nachweisen, erlaubte die geprüfte Reaktion gewisse Verbindungstypen voneinander zu unterscheiden.

Bei der Durchprüfung der *Absorptionsspektren* zeigten zwar alle Verbindungen in ihrem Farbkomplex ein Maximum um 575 mμ, doch ergaben sich daneben noch gewisse Besonderheiten (vgl. auch Abb. 3). Die Digitanolglykoside vom Digininntyp (Diginin, Digifolein und Lanafolein) wiesen außerdem ein zweites, niedrigeres Maximum bei 500 mμ auf, das wahrscheinlich einem zweiten aktiven Methylen im Molekül entsprach. Digipronin und Digipurpurin, zwei weitere Vertreter dieser Reihe, deren besondere Konstitution noch nicht sichergestellt ist, hatten dieses Nebenmaximum nicht; ihre Absorptionskurven stimmten dem Typ nach mit denen der C_{14}OH-Verbindungen überein. Die $C_{12,14}$-OH-Verbindungen Lanatosid C und Digoxin, außerdem k-Strophanthosid, zeigten im Spektrum eine weitgeschwungene Krümmung zwischen 640 und 710 mμ. Bei k-Strophanthidin sowie den $C_{14,16}$OH-Verbindungen war die gleiche Krümmung, allerdings nur etwa in halber Höhe, nachweisbar. — Diese Feststellungen können bei der Zuordnung neuer Verbindungen zu einer dieser Reihen Hilfe leisten.

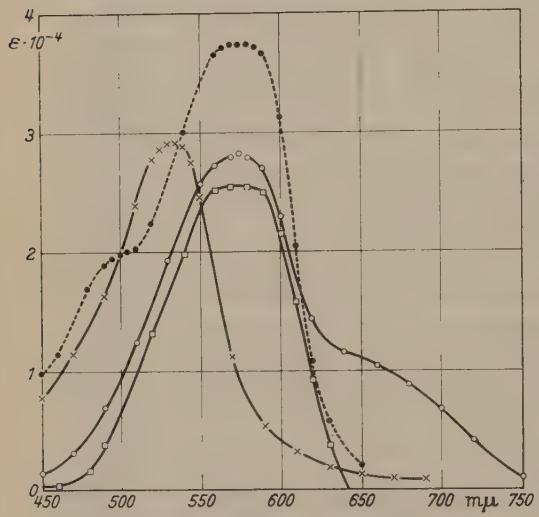


Abb. 3. *Absorptionsspektren der Farbsalze des m-Dinitrobenzols in Pyridin* mit Natronlauge ×——×, Diginin •-----• Digoxin ○——○ und Digipurpurin □——□

In der *Geschwindigkeit der Farbsalz-Bildung* ergaben sich teilweise beträchtliche Unterschiede (vgl. Abb. 1 und Tab. 2). Mit großer Geschwindigkeit, nämlich in weniger als 1 min, lief die Reaktion bei den $C_{14,16}$OH-Verbindungen[1] sowie bei Digipronin ihrem Endpunkt zu. In zunehmender Reaktionszeit folgten mit 10 min die $C_{12,14}$OH-Verbindungen und $C_{5,14}$OH-Verbindungen sowie Digipurpurin und mit 15 min die C_{14}OH-Vertreter sowie Digifolein, Lanafolein und Diginin mit einer OH-Gruppe am C_2 oder ohne OH-Gruppe. Die $C_{3,5}$OH-Verbindung iso-Strophan-

[1] Die beim Gitaloxin vorhandene Formylierung zeigte keinen Einfluß auf die Kinetik der Farbsalz-Bildung.

thidin reagierte mit 60 min weitaus am langsamsten. — Wenn auch bei den Digitanolen und beim iso-Strophanthidin sicher die besondere Konstitution für die Reaktionsgeschwindigkeit von Bedeutung war, so ließen sich doch aus dieser Zusammenstellung gewisse allgemeinere Gesichtspunkte gewinnen. Zunächst erwies sich die sterische Orientierung des Butenolid-Ringes als bedeutungslos. Weiter zeigte die Verknüpfung des C_3-Hydroxyls mit einer Zuckerkette verschiedener Länge keinen wesentlichen Effekt. Dagegen bewirkten die Hydroxylgruppen des Steroidkerns mit wachsender Annäherung an das aktive Methylen eine zunehmende Verkürzung der Reaktionszeiten. Am kräftigsten aktivierend wirkte sich die Kombination von Hydroxylen am C_{14} und C_{16} aus. — Für Digipronin und Digipurpurin, die jeweils eine in der Position noch nicht festgelegte OH-Gruppe besitzen (Tschesche et al. [2—4]), werden nach der oben gegebenen Einordnung in die Geschwindigkeitsskala Rückschlüsse auf die Lage dieser OH-Gruppen nahegelegt.

Die festgestellten Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten oder in den Farbstabilitäten bei Gegenwart von Lauge oder Säure (siehe oben) ließen sich in einem beschränkten Umfang zu einer getrennten Bestimmung gewisser Einzelkomponenten in Glykosidmischungen ausnutzen. Beispielsweise konnte unter Verwertung derartiger Differenzen die Reaktion in einer Digitoxin-Gitoxin-Mischung so geführt werden, daß ganz vorwiegend das eine oder andere Glykosid bestimmt wurde.

IV. Ein Vergleich des neuen Verfahrens mit der Pikrinsäure- und Xanthydrol-Reaktion. *Absorptionsspektren.* Die untersuchten Farbsalze des m-Dinitrobenzols besaßen in Pyridin sämtlich ein Maximum um 575 mμ (vgl. Abb. 3 und Tab. 2). Da in der Nähe (577 u. 579 mμ) relativ starke Linien der Quecksilberdampf-Lampe liegen, welche sich mit Metallinterferenz-Filtern isolieren lassen, erlaubte diese Lage eine bequeme Meßbarkeit der optischen Dichten an einem entsprechenden Filtergerät. Hierbei wurde zwar nicht immer ganz im Maximum gemessen und war auch das gefilterte Licht nicht ganz monochromatisch. Im Vergleich zu den Meßwerten am Spektralphotometer ergaben sich jedoch nur geringe Einbußen an Empfindlichkeit (durchschnittlich um 7 %).

Das Absorptionsmaximum bei der Pikrinsäure-Reaktion liegt nach übereinstimmenden Angaben (Bell u. Krantz [4]; Demoen u. Janssen; Kaern; Rowson; Tschesche et al. [1]) für die Cardenolide zwischen 490 und 495 mμ. Da es in der Nähe des Maximums keine Quecksilberlinien gibt und die Absorptionskurve des Reagenses einen ähnlichen Verlauf wie der eigentliche Farbkomplex hat, ist die Messung im Maximum nur mit Hilfe eines lichtstarken Spektrophotometers möglich. Für Filtergeräte wird daher die Messung bei der weit außerhalb des Maximums gelegenen Wellenlänge 525 mμ empfohlen (Bell u. Krantz [2]; Kennedy; U. S. P. XIV). Unter diesen Meßbedingungen ist jedoch eine

Verminderung der Empfindlichkeit auf weit weniger als die Hälfte des Wertes bei 495 mμ in Kauf zu nehmen und wird das Lambert-Beersche Gesetz nur noch in einem schmalen Konzentrationsbereich erfüllt (Kennedy).

Bei der Xanthydrol-Reaktion zeigten die Absorptionskurven zwischen 400 und 700 mμ (vgl. auch die Abb. 2 bei Repke) unter allen untersuchten Verbindungen keine wesentlichen Differenzen. Die Glykoside mit den 2-Desoxyzuckern D-Digitoxose, D-Cymarose, D-Oleandrose und D-Diginose ließen sich also über die zugehörigen Absorptionsspektren nicht unterscheiden. Die Lage der Absorptionsmaxima (vgl. Tab. 2) in der Nähe der Hg-Linie 546 mμ erlaubte die bequeme Meßbarkeit an einem mit dem entsprechenden Metallinterferenz-Filter ausgerüsteten Gerät. Im Vergleich zu einem Spektralphotometer wurde dabei die Empfindlichkeit des Verfahrens kaum beeinträchtigt (durchschnittlich um 3%).

Molare Absorptionskoeffizienten. (Vgl. Tab. 2.) Die m-Dinitrobenzol-Methode ergab nicht die an sich zu fordernde, völlige Übereinstimmung der Koeffizienten bei den einzelnen Verbindungen. Der theoretische Wert dürfte bei 29000 liegen. Die Abweichungen nach unten gehen wahrscheinlich vor allem auf die Alkali-Empfindlichkeit der entsprechenden Verbindungen zurück (vgl. Tab. 1). Die Digitanole Diginin, Digifolein und Lanafolein brachten dagegen höhere Koeffizienten als der Theorie entsprach. Diese Eigenschaft hing offenbar mit dem Vorhandensein des charakteristischen Nebenmaximums zusammen, dessen Absorption noch teilweise in den Bereich des Hauptmaximums hineinreichte (vgl. Abb. 3). Digipurpurin und Digipronin, denen das Nebenmaximum fehlt, verhielten sich wie die Cardenolide. Mit 3,5-Dinitrobenzoesäure reagieren Diginin, Digifolein und Lanafolein gleichfalls stark, aber Digipurpurin und Digipronin sehr schwach (Tschesche et al. [2—4]). — Überraschend war die zwar langsame und unvollständige, aber doch positive Reaktion des iso-Strophanthidins. Scillaren A gab keine Reaktion.

Die Pikrinsäure-Reaktion brachte bei den Cardenoliden mit Ausnahme von Lanatosid B eine gute Übereinstimmung der Koeffizienten. Die Digitanole vom Diginin-Typ zeigten im Vergleich dazu nur rund $^1/_3$ Reaktionsfähigkeit. Für Diginin hatten schon Bell, Carr u. Krantz das gleiche festgestellt. Bei Hagemeier findet sich ohne nähere Angaben die Feststellung, daß Diginin die höchste Farbintensität unter den untersuchten Glykosiden ergab. — Digipurpurin wies die schwächste Reaktion auf. In Bestätigung der Feststellungen von Jacobs bzw. Lendle u. Schmelzer wurden iso-Strophanthidin und Scillaren A negativ reagierend gefunden.

Die Xanthydrol-Reaktion ergab einen molaren Absorptionskoeffizienten von rund 16000, wenn der Berechnung die jeweilige Molarität an reaktionsfähigem Desoxyzucker zugrunde gelegt wurde. Der Koeffizient

lag damit bedeutend niedriger als bei der m-Dinitrobenzol-Methode und etwa in der gleichen Höhe wie beim Pikrinsäure-Verfahren. Die trotzdem teilweise größere Empfindlichkeit der Xanthydrol-Methode beruht darauf, daß im Glykosidmolekül bis zu 3 Mole reaktionsfähigen Desoxyzuckers vorliegen können. Um ein schnelles Urteil über die Leistungsfähigkeit dieser Methode zu ermöglichen, wurden daher bei der Berechnung

Tabelle 3. *Spezifitätsvergleich zwischen der m-Dinitrobenzol-, Pikrinsäure- und Xanthydrol-Reaktion*

Die Verbindungen wurden in äquimolaren Mengen ($1 \cdot 10^{-7}$ Mol) untersucht und die Ergebnisse in Prozenten ausgedrückt, wobei der ε_{max}-Wert von Digitoxin als 100 gesetzt war. Reaktionszeiten: t_{max}(a) und $2 \cdot t_{max}$ (b) jeweils für Digitoxin. Ausführung der m-Dinitrobenzol-Reaktion nach der Serienmodifikation

Verbindung	Prozent des Digitoxin-Wertes bei der Reaktion mit				
	m-Dinitrobenzol		Pikrinsäure		Xanthydrol
	a	b	a	b	
Androstan-3βol, -17on . . .	9	18	1	1	0
Androstan-3αol, -17on . . .	7	15	2	2	0
Androstan-17βol, -3on . . .	16	28	3	3	0
Oestron	4	8	<1	1	<1
Aceton	34	48	0	3	0
Kreatinin	13	16	51	80	0
Thiamin-Hydrochlorid	3	4	0	0	0
Tryptophan	0	0	0	0	7

Mit allen 3 Reagentien blieben die Proben negativ bei: Digitonin, Histidin-Chlorhydrat, Nicotinsäureamid, Pyridoxin, Biotin, Panthotensaurem Ca, meso-Inosit, Glucose, Arabinose, Galaktose, Mannose, Saccharose und Lactose.

der Werte in Tab. 2 jeweils die Molaritäten an Glykosid zugrunde gelegt. — Ein Vergleich der Einzelwerte legt die Annahme nahe, daß bei den Lanatosiden jeweils nur 2 Mole Digitoxose reaktionsfähig sind. Weiter zeigt sich, daß die Cymarose im k-Strophanthosid gegen die Erwartung praktisch stumm bleibt. Zur Erklärung ist anzunehmen, daß die Salzsäure im Xanthydrol-Reagens aus den Molekülen der Lanatoside jeweils neben 1 Mol Digilanidobiose nur 2 Mole Digitoxose und aus k-Strophanthosid nur Strophanthotriose freisetzt. Die genannte Biose und Triose reagieren nun offenbar bei dieser Methode genauso wenig wie bei der bekannten Desoxyzucker-Reaktion von Keller-Kiliani (Stoll u. Kreis; Stoll, Renz u. Kreis). — Die Spezifität der Xanthydrol-Methode als 2-Desoxyzucker-Reaktion wird durch die negativen Teste

mit dem Digitalose-Glykosid Digipronin und dem Rhamnose-Glykosid Scillaren A unterstrichen.

Die in der letzten Spalte der Tab. 2 angegebenen Verhältniszahlen der molaren Extinktionskoeffizienten bei den drei untersuchten Methoden sind teilweise so charakteristisch, daß sie bei der Identifizierung gewisser Verbindungen Hilfe leisten können.

Spezifität. Obgleich m-Dinitrobenzol und Pikrinsäure zur gleichen Gruppe von Reagentien gehören, ergaben sich doch bei der Prüfung einer Reihe von Verbindungen beträchtliche Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit (vgl. Tab. 2 u. 3). Im Endergebnis war die Spezifität der Pikrinsäure-Methode im Vergleich zum m-Dinitrobenzol-Verfahren über das Maß der geringeren Empfindlichkeit hinausgehend als größer anzuerkennen. Die einzige Ausnahme bildete Kreatinin. Die in Tab. 3 zusammengestellten, positiv reagierenden Substanzen benötigten eine längere Zeit für die Farbentwicklung als die Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen. Bei beiden Methoden läßt sich also die Anwesenheit von Verunreinigungen durch ein über die Standardzeiten hinaus anhaltendes Ansteigen der Farbwerte erkennen. — Die Xanthydrol-Reaktion bestätigte sich des weiteren als weitgehend spezifische 2-Desoxyzucker-Methode (siehe Anmerkungen zu Tab. 3).

Diskussion

I. Die Bedeutung des Lösungsmittels. Für Äthanol ist nach Canbäck [2] anzunehmen, daß sich das Carbanion über eine Wasserstoff-Brücke mit diesem Lösungsmittel verbindet und dadurch stabilisiert. Diese Annahme ist geeignet, die unvollständige Bildung und die große Zersetzlichkeit der Farbsalze des m-Dinitrobenzols[1] in Äthanol zu erklären. Pyridin dagegen kann sich offenbar nicht mit dem Carbanion verbinden. Aus dieser Annahme läßt sich die ungewöhnliche Beständigkeit der Farbsalze des m-Dinitrobenzols in Pyridin herleiten. Weiter wird damit eine Erklärung für die besonders hohe Reaktivität des Carbanions in Pyridin gegeben. Diese wird vor allem auch durch die überraschende Farbsalz-Bildung zwischen m-Dinitrobenzol und iso-Strophanthidin demonstriert[2]. iso-Strophanthidin besitzt bekanntlich keine Doppelbindung mehr im Laktonring. Gerade diese Ungesättigtheit war aber bisher auf Grund

[1] Wie die relative Stabilität der Farbsalze der Pikrinsäure und der 3,5-Dinitrobenzoesäure in Äthanol zeigt, ist für die Beständigkeit nicht nur das Lösungsmittel, sondern auch die Art der Polynitro-Verbindung maßgebend.

[2] *Anmerkung bei der Korrektur.* Auch Dihydro-Digitoxigenin (t_{max} = 120 min, ε_{max} = 8700) und Dihydro-Ouabagenin (t_{max} = 120 min, ε_{max} = 5300) bilden in Pyridin Farbsalze mit m-Dinitrobenzol. Bei Einhaltung der für die Farbentwicklung mit den entsprechenden Butenolid-Verbindungen ausreichenden Zeit (10 min) werden aber diese Dihydro-Derivate infolge ihrer langsamen und unvollständigen Farbsalz-Bildung praktisch nicht mitbestimmt.

negativer Reaktionen von iso- und Dihydro-Verbindungen mit Nitroprussid-Natrium (Fieser u. Fieser) und mit Pikrinsäure (Jacobs) für eine Voraussetzung der Bildung eines Carbanions aus dem α-Methylen gehalten worden. — Pyridin zeigte gegenüber Äthanol den weiteren Vorzug, daß sich darin alle geprüften Verbindungen mit Ausnahme von Digipurpurin ausgezeichnet lösten.

II. Die Empfindlichkeit der hauptsächlichen Butenolid-Verfahren. Die entsprechenden Daten sind in Tab. 4 zusammengestellt. Die meisten der aufgeführten Reaktionen sind als relativ unempfindlich zu bewerten. Da die Messung bei 217 mμ im allgemeinen für quantitative Bestimmungen nicht in Frage kommt, stehen sich also vor allem die Pikrinsäure- und die neue m-Dinitrobenzol-Methode gegenüber. Die Empfindlichkeit des Pikrinsäure-Verfahrens ist bei Messung im Absorptionsmaximum um etwa $^1/_3$ bis $^1/_2$ geringer als die der m-Dinitrobenzol-Methode. Allerdings setzen derartige Meßergebnisse die Verwendung eines lichtstarken Spektrophotometers voraus. Wenn aber an einem Filtergerät bei 525 mμ gemessen werden muß, dann beträgt die Empfindlichkeit nur etwa den dritten Teil im Vergleich zur konkurrierenden Bestimmungsmethode. Bei Untersuchungen, welche ein besonders empfindliches Verfahren verlangen, gibt diese Feststellung den Ausschlag zugunsten der m-Dinitrobenzol-Reaktion in Pyridin, zumal diese ja auch bei Messungen an einem Filtergerät praktisch ihre volle Empfindlichkeit behält. — Das vorgeschlagene Verfahren hat sich inzwischen bei der Bestimmung von Digitoxigenin in Geweben und Ausscheidungen bewährt[1].

III. Zur chemischen Wertbestimmung von Herzglykosiden. Während eine chemische Wertbestimmung bei galenischen Digitalispräparaten abgelehnt werden muß (vgl. Bell u. Krantz [1]; Eastland et al.; Stoll u. Jucker; Vos u. Welsh), ist diese bei Präparaten aus kristallisierten, zu über 90% einheitlichen Glykosiden als aussichtsreich zu beurteilen. In der pharmazeutischen Industrie werden auch bei der Fertigungskontrolle chemische Methoden statt der biologischen Titration angewandt (Anderson u. Chen). Die U. S. P. XIV hat für Digitoxin und Digoxin colorimetrische Bestimmungsverfahren vorgeschrieben. Auch für das DAB 7 ist zur Bestimmung von Digitoxin und Strophanthin die Aufnahme einer chemischen Methode (Pikrinsäure-Reaktion) statt biologischer Verfahren vorgeschlagen worden (Lendle; Neuwald [2]). — Natürlich sind verläßliche Resultate mit den Zubereitungen kristallisierter Glykoside nur nach angemessenen Isolierungsprozeduren zu erhalten, welche eine Befreiung von störenden Zusätzen wie Magnesiumstearat oder Lactose gewährleisten (vgl. Banes u. Carol; Banes). Weiter haben die Erfahrungen bei der Kontrolle von Digitoxin-Präparaten mit der in der

[1] Über Untersuchungen zur Verteilung und zum Stoffwechsel von Digitoxigenin bei der Ratte wird später berichtet.

Tabelle 4. *Vergleich der molaren Extinktionskoeffizienten* ε_{max} *bei den Methoden, welche den Butenolid-Ring der Cardenolide nachweisen*

Methodik (Reagentien)	Lanatosid A	Digitoxin	Digitoxigenin	Lanatosid B	Gitoxin	Lanatosid C	Digoxin	Empfindlichkeit*
m-Dinitrobenzol in Pyridin . . .	29900[1]	29500[1]	27000[1]	24400[1]	24400[1]	29000[1]	28200[1]	100
	18400[2]	16100[2]	18800[2]	19200[2]	16700[1]	16200[2]	17700[2]	
	16400[3]	14500[4]	16300[1]	14800[1]		12900[5]	15400[5]	
Pikrinsäure	17200[1]	17400[5]				16900[1]	16200[1]	58
		16700[1]						
Messung bei 217 mμ	15400[6]	15400[6]	15400[6]	15400[6]	15400[6]	15400[6]	15400[6]	52
		15500[2]						
m-Dinitrobenzol in Äthanol . .	4200[3]	11110[7]	10720[7]	—	4120[7]	—	—	14
		14700[4]						
	5300[3]	6500[4]	4700[10]		4200[10]		8300[8]	
		9700[8]		—		—		18
3,5-Dinitrobenzoesäure		8500[9]						
		5000[10]						
Nitroprussid-Natrium	1200[3]	—	—	—	—	—	—	4
β-Naphthochinon-4-sulfonat . .	1100[3]	—	—	—	—	—	—	4

* Vergleich der Werte für Lanatosid A. — [1] Diese Arbeit. — [2] Demoen u. Janssen. — [3] Tschesche et al. [1]. — [4] Rowson. — [5] Kennedy. — [6] Dorfman. — [7] Canbäck [3]. — [8] Pratt. — [9] Tattje. — [10] Brindle et al.

U. S. P. XIV vorgeschriebenen Pikrinsäure-Reaktion gezeigt, daß für die chemische Gehaltsbestimmung ein Verfahren allein nicht ausreicht (Braun u. Lusky). Hierbei handelt es sich vor allem um die Erfassung von Verunreinigungen mit Gitoxin.

Das vorgeschlagene m-Dinitrobenzol-Verfahren erlaubt zwar eine Differenzierung zwischen Digitoxin und Gitoxin, jedoch sind die außerordentlich empfindlichen Fluorescenzproben nach Pesez [1] oder Murphy für die Erkennung von Verunreinigungen mit Gitoxin als geeigneter anzusehen. Im Vergleich zur alten Ausführungsform der m-Dinitrobenzol-Reaktion in Äthanol, die in der U. S. P. XIV für Digoxin vorgeschrieben ist, hat das neue Verfahren in Pyridin neben gesteigerter Empfindlichkeit den Vorzug, daß es darin keinen kritischen Zeitfaktor gibt und daß statt bei 0° C jetzt bei Zimmertemperatur gearbeitet werden kann. — Für die quantitative Bestimmung von Glykosiden mit reaktionsfähigen 2-Desoxyzuckern hat sich in der vorliegenden Arbeit die Xanthydrol-Reaktion als wertvoll erwiesen; ihr ist vor der relativ unempfindlichen Keller-Kiliani-Reaktion[1] der Vorzug zu geben. — Bei einer Kombination von Butenolid- und Desoxyzucker-Methode lassen sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit aus einem Vergleich der molaren Absorptionskoeffizienten Rückschlüsse auf Identität und Reinheit eines Präparats ziehen.

Zusammenfassung

Die m-Dinitrobenzol-Reaktion wird bei Ausführung in Pyridin statt wie bisher in Äthanol zu einer überlegenen Methodik für die quantitative Bestimmung von Cardenolid- und Digitanol-Verbindungen. Die Überlegenheit über das alte Verfahren drückt sich in 3—7fach höherer Empfindlichkeit und dem Erreichen einer praktischen Stabilität der Farbsalze aus. Auch im Vergleich zu anderen bekannten Verfahren, welche auf der Reaktion von Polynitro-Verbindungen mit aktiven Methylengruppen basieren oder sonst den Laktonring der Cardenolide nachweisen, erweist sich die neue Methodik als die weitaus empfindlichste. Allerdings geht mit der Steigerung der Empfindlichkeit ein Verlust an Spezifität einher.

Als Ergebnis einer eingehenden Untersuchung der Faktoren, welche die Farbsalzbildung in Pyridin beeinflussen, werden die optimalen Reaktionsbedingungen entwickelt. Auf Grund der günstigen Lage der Absorptionsmaxima in der Nähe der Hg-Linie 578 mμ kann die Messung praktisch ohne Verlust an Empfindlichkeit mit einem einfachen Filtergerät vorgenommen werden. Die untersuchten Verbindungen lassen sich in Gruppen einteilen, die charakteristische Unterschiede zeigen in der Geschwindigkeit der Farbsalzbildung, in den Absorptionsspektren und in

[1] Beispielsweise betragen für Digitoxin die molaren Absorptionskoeffizienten beim Keller-Kiliani-Test 9000 (Rowson) und bei der Xanthydrol-Probe 49600.

der Beständigkeit gegen Lauge und Säure. Das unterschiedliche Verhalten wird neben der besonderen Konstitution einiger Steroide vor allem von der Position der Hydroxylgruppen am Steroidkern bestimmt. — Vergleichsbestimmungen mit der Pikrinsäure- und Xanthydrol-Reaktion zeigen, daß sich einige Typen von Verbindungen durch die Verhältniszahlen der molaren Absorptionskoeffizienten charakterisieren lassen.

Nach Erwägungen über den Einfluß der Lösungsmittel Äthanol und Pyridin auf die Farbsalz-Bildung werden die Ergebnisse unter den Gesichtspunkten einer Beurteilung der geprüften Methoden und ihrer Ausnutzung für eine chemische Wertbestimmung von Herzglykosid-Präparaten diskutiert.

Die Durchführung dieser Untersuchung wurde insbesondere von Herrn Prof. Dr. Dr. K. Lohmann gefördert. Die verständnisvolle Mitarbeit von Fräulein Sorma Klesczewski und Fräulein Hannelore Stauske wird dankbar anerkannt.

Literatur

Anderson, R. C., and K. K. Chen: J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **35**, 353 (1946).
Baljet, H.: Schweiz. Apoth.-Ztg **56**, 71 u. 84 (1918).
Banes, D.: J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **43**, 355 (1954).
Banes, D., and J. Carol: J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **42**, 674 (1953).
Bell, F. K., C. J. Carr and J. C. Krantz jr.: J. Pharmacol. exp. Ther. **89**, 143 (1947).
Bell, F. K., and J. C. Krantz jr.: [1] J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **35**, 260 (1946). — [2] J. Pharmacol. exp. Ther. **87**, 198 (1946). — [3] J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **37**, 297 (1948). — [4] J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **39**, 319 (1950).
Bellet, P.: Ann. pharmac. franç. **8**, 471 (1950).
Braun, H. A., and L. M. Lusky: J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **43**, 440 (1954).
Brindle, H., G. Rigby and S. N. Sharma: J. Pharm. (Lond.) **5**, 876 (1953).
Canbäck, T.: [1] J. Pharm. (Lond.) **1**, 201 (1949). — [2] Svensk farm. T. **54**, 1 (1950). — [3] **54**, 201 (1950).
Demoen, P., and P. Janssen: J. Amer. Pharm. Ass., sci Ed. **42**, 635 (1953).
Dorfman, L.: Chem. Rev. **53**, 90 (1953).
Eastland, C. J., D. P. Lawday and E. H. B. Sellwood: J. Pharm. (Lond.) **4**, 811 (1952).
Fieser, L. F., and M. Fieser: Natural products related to phenanthrene. NewYork: Reinhold Publishing Corporation 1949.
Hagemeier, A.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **194**, 195 (1940).
Hassall, C. H., and A. E. Lippman: The Analyst **78**, 126 (1953).
Hazard, R., R. Charonnat et P. Lechat: Ann. pharmac. franç. **12**, 81 (1954).
Jacobs, W. A.: Physiol. Rev. **13**, 222 (1933).
Kaern, M.: Dansk T. Farm. **26**, 89 (1952).
Kaiser, F.: Chem. Ber. **88**, 556 (1955).
Kedde, D. L.: Pharm. Weekbl. **82**, 741 (1947).
Kennedy, E. E.: J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **39**, 25 (1950).
Lendle, L.: Arzneimittel-Forsch. **1**, 242 (1951).
Lendle, L., u. W. Schmelzer: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **177**, 622 (1935).
Lisz, E.: Dissertation. Humboldt-Universität. Berlin 1956.

Marthoud, R.: Thèse Doct. Un. (Pharm.), Lyon 1935.
Mesnard, P., et A. Lafargue: Bull. Soc. Pharm. Bordeaux **91**, 160 (1953).
Murphy, J. E.: J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **43**, 659 (1954).
Neuwald, F.: [1] J. Amer. Pharm. Ass., sci. Ed. **39**, 172 (1950). — [2] Arzneimittel-Forsch. **1**, 241 (1951).
Pesez, M.: [1] Ann. pharmac. franç. **8**, 746 (1950). — [2] **10**, 104 (1952).
Pratt, E. L.: Analyt. Chem. **24**, 1234 (1952).
Raymond, W. D.: The Analyst **63**, 478 (1938); **64**, 113 (1939).
Repke, K.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 261 (1958).
Rowson, J. M.: J. Pharm. (Lond.) **4**, 814 (1952).
Stoll, A., u. E. Jucker: Herzglykoside. In: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse **3**, 205 (1955). Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer.
Stoll, A., u. W. Kreis: Helv. chim. Acta **16**, 1049 (1933).
Stoll, A., J. Renz u. W. Kreis: Helv. chim. Acta **20**, 1484 (1937).
Tattje, D. H. E.: J. Pharm. (Lond.) **9**, 29 (1957).
Tschesche, R., G. Grimmer u. F. Seehofer: [1] Chem. Ber. **86**, 1235 (1953).
Tschesche, R., u. G. Grimmer: [2] Chem. Ber. **88**, 1569 (1955).
Tschesche, R., u. G. Buschauer: [3] Justus Liebigs Ann. Chem. **603**, 59 (1957).
Tschesche, R., G. Lipp u. G. Grimmer: [4] Justus Liebigs Ann. Chem. **606**, 160 (1957).
U. S. P. XIV. The Pharmacopeia of the United States of America, fourteenth revision. Easton (Pa.): Mack Publishing Company 1950.
Vencker, P.: Dissertation. Humboldt-Universität. Berlin 1956.
Vos, B. J., jr., and L. H. Welsh: J. Pharmacol. exp. Ther. **85**, 346 (1945).
Wendland, W.: Dissertation. Humboldt-Universität. Berlin 1956.
Wendland, W., u. K. Lohmann: Biochem. Z. **328**, 420 (1957).
Zimmermann, W.: Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.

Dozent Dr. med. Kurt Repke, Institut für Medizin u. Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 164—178 (1958)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg
und dem Pharmakologischen Institut der Farbwerke Hoechst AG.

Untersuchungen über die Anaesthesie der Dehnungs- und Berührungsreceptoren durch einige Lokalanaesthetica im Vergleich zur hustenstillenden Wirkung

Von
Richard Sell, Ernst Lindner und Herbert Jahn

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Februar 1958)

Die Forschungen der letzten Jahre auf den Gebieten der Atmungsphysiologie führten auch zu einer veränderten Betrachtungsweise des Hustenreflexes und der Anschauungen über die Möglichkeiten der Hustendämpfung. Während bei der bisherigen Betrachtungsweise dem Hustenreiz, also der Erregung der sensiblen Nervenendigungen im Atemtrakt und seiner Bekämpfung mit Analgetica die meiste Aufmerksamkeit geschenkt wurde, wandte sich das Interesse in der letzten Zeit mehr dem Ablauf des Hustenreflexes selbst zu*, besonders unter dem Eindruck der Tatsache, daß es gut wirksame Hustenmittel gibt, die keine analgetische Wirkung haben. Man erkannte — aufbauend auf den Untersuchungen über die Organisation der Atemzentren und in Analogie zu anderen polysynaptischen Reflexen — daß man den Husten als eine modifizierte Atmung ansehen muß. Da die Tiefe der Inspiration über die Erregung der Dehnungsreceptoren von den Atemzentren reguliert wird, eine tiefe Inspiration aber eine Vorbedingung für den Hustenstoß ist, folgerte Bucher, daß eine Anaesthesie dieser Dehnungsreceptoren zur Hustenstillung führen müsse. Eine solche die Dehnungsreceptoren anaesthesierende und hustenstillend wirkende Substanz wurde von Bucher[1] in einem Derivat des „Pantocain", dem Nona-Äthylen-glykol-monomethylester der 4-Butylaminobenzoesäure — „AGB" — gefunden.

Wir prüften nun die Frage, welchen Einfluß verschiedene unterschiedlich stark hustenstillend wirksame Lokalanaesthetica, die aber alle etwa gleichstark lokalanaesthetisch wirken wie Pantocain, auf die Dehnungsreceptoren der Lunge und die sensiblen Nervenendigungen in der Trachea haben.

Methodik**

1. Versuche zum Nachweis von Einflüssen verschiedener Substanzen auf die Impulse der Dehnungsreceptoren der Lunge. Versuchstiere waren 35 Meer-

* 2,3,10–12,15.

** Für die technische Hilfe beim Aufbau der Apparate sei Herrn G. Volbehr aus dem physiologischen Institut Heidelberg gedankt.

schweinchen im Gewicht von 350—500 g in Urethannarkose. Nach einem vorderen medianen Schnitt durch die Halshaut wurde eine Trachealkanüle zur künstlichen Beatmung angebracht. Die Beatmung erfolgte mit einer Frequenz und Stärke, die gerade ausreichte, die Spontanatmung auszuschalten. Diese Werte wurden konstant gehalten und gaben somit reproduzierbare Dehnungen der Lunge. Der Halsvagus wurde auf einer Seite aufgesucht, zentral angeschlungen und durchtrennt. Die Ableitung der Potentiale erfolgte über einen von Göpfert u. Jahn[8] entwickelten RC-Verstärker, wobei neben dem eigentlichen Aktionsstrombild das Zeit-Spannungsintegral auf einem Kathodenstrahloscillographen dargestellt wurde. Hierzu luden die Einzel-Potentiale nach Gleichrichtung den zu einem RC-Glied gehörigen Kondensator auf, dessen Spannung somit ein Maß für Frequenz und Amplitude der Einzelpotentiale war. Dieser Spannungsverlauf wurde nach entsprechender Nachverstärkung auf einem zweiten Strahl des Kathodenstrahlrohres sichtbar gemacht. Man erhielt dabei das Bild einer Kurvenform, deren wellenförmiger Verlauf den mittleren Potentialschwankungen bei der Dehnung der Lunge entsprach. Wir nennen einen solchen Wellengang „*Potentialspindel*". Unsere Anordnung ähnelt der von Zipf u. Reichertz[22] angegebenen. Zur Registrierung der Atmung war der Kolben der Atempumpe mit dem Schleifer eines Kohleschiebewiderstandes verbunden, an dem eine Gleichspannung von 85 V lag. Die zwischen dem Schleifer und dem einen Widerstandsende abgenommene Spannung ändert sich synchron mit dem Gang der Atempumpe.

Die Spannungsregistrierung erfolgte ebenfalls auf dem Schirm des Oscillographen, auf dem somit gleichzeitig drei Vorgänge, die Potentiale, ihr Zeit-Spannungsintegral und die Atmung sichtbar gemacht werden konnten. Wir benutzten dabei ein Zweistrahloscillographenrohr, bei dem der eine Strahl unter Vorschaltung eines Elektronenschalters zur Registrierung von 2 Vorgängen (Zeit-Spannungsintegral u. Atmung) diente. Injektionen erfolgten in die V. jugularis. Die Ergebnisse werden photographisch aufgezeichnet bei einer Filmgeschwindigkeit von etwa 8 cm pro Sekunde. Die Registrierung erfolgte unter dauernder Kontrolle durch Auge und Ohr (Lautsprecher) in Abständen von 1—5 min. Dabei wurde das Übersehen flüchtiger Effekte durch eben diese akustische und optische Kontrolle ausgeschaltet.

2. Untersuchung über den Einfluß verschiedener Substanzen auf die Impulse aus den Receptoren der Atemwege. Die Versuche wurden an 15 Katzen in Urethan-Chloralose-Narkose vorgenommen. Meerschweinchen erwiesen sich als ungeeignet. Bei Rückenlage und Halsschnitt vorne medial wurde die Trachea freigelegt und eine Kanüle tief angebracht. Die Tiere wurden ihrer Spontanatmung überlassen. Der Larynx wurde vorne medial gespalten und durch Haltefäden gespreizt, der N. Laryng. cran. beiderseits aufgesucht, angeschlungen und zentral durchtrennt. Die Ableitung der Impulse erfolgte mit der vorher beschriebenen Apparatur. Wegen der hohen Spontanaktivität der Receptoren am ganzen Nerven wurde eine Aufsplitterung notwendig, die dann zu gut auszählbaren, vergleichbaren Impulsen führte. Außer der Spontanaktivität wurde die Antwort auf einen Reiz registriert. Dabei benutzten wir zur Konstanterhaltung von Reizstärke und Reizdauer ein über ein Zeitrelais geschaltetes, mit einer Taste bedienbares, magnetisches Reizhämmerchen mit einer Reizborste. Die Lokalisation der zu einem Nerven gehörenden Receptoren wurde durch Abtasten der Larynxwand mit der Borste unter akustischer Kontrolle der Receptorpotentiale im Lautsprecher möglich. Auf die ermittelten Areale wurde dann das Hämmerchen eingestellt. Die Reizmarkierung erfolgte mit dem 2. Strahl des Oscillographen. Zur gleichzeitigen Registrierung des Blutdrucks benutzten wir ein kapazitives Manometer, dessen Schwankungen auf ein Galvanometer übertragen wurden. Änderung der Impulshöhe erfolgte leicht bei

Austrocknung der Nerven. Um dem vorzubeugen, wurden sie regelmäßig mit Ringer beträufelt.

3. Bestimmung der hustenstillenden Wirkung. Die hustenstillende Wirkung wurde an Katzen in Pernoctonnarkose bestimmt. Der N. laryngicus cranialis wurde beiderseits freigelegt und beiderseits elektrisch gereizt. Die einzelnen Reizperioden hatten eine Dauer von 5/10 sec. Zur Verwendung gelangte ein Strom, der in einzelnen Versuchen 30, in anderen 60 Hertz aufwies, je nachdem auf welche Frequenz das Tier am besten reagierte. Die Stromstärke schwankte von Versuch zu Versuch zwischen 0,3—0,6 Milliamp., wurde dagegen während des Versuches konstant gehalten. Die Pausen während einer Reizperiode wurden so bemessen, daß sie 50% der Reizperiode ausmachten. Als Reizgerät wurde der Stimulator der Firma Netheler und Hinz, Hamburg, in Verbindung mit einer Hirschschaltuhr verwendet. Zwischen den Reizperioden wurden Pausen von 2 min eingelegt. Die Stärke der Hustenstöße war am gleichmäßigsten, wenn während der Inspiration gereizt wurde. Eine Kanüle wurde entweder durch Intubation in die Trachea eingeführt oder dicht unterhalb des Kehlkopfes in die Trachea gebracht und fixiert. Ein Arm der doppelarmigen Kanüle wurde mit einer Marey-Kapsel verbunden, während der andere der Atmung dienende Arm mit einem Gummiansatz versehen wurde, der durch eine Klemme so weit gedrosselt werden konnte, daß der auf der Marey-Kapsel sitzende Schreiber die normalen Atemzüge deutlich anzeigte. Jeder Hustenstoß schleuderte den Schreiber in die Höhe und registrierte den Hustenstoß auf einem Rußkymographen. Bei 11 Katzen wurden die Nervi vagi beiderseits freigelegt und peripher von der Einmündungsstelle der Nervi laryngici craniales durchtrennt. Die an den beiden Nervi laryngici craniales angelegten Elektroden lagen also cranialwärts von der Durchschneidungsstelle des Vagus. Die durch die Reizung erzeugten Impulse konnten daher zentralwärts gelangen, während alle afferenten Impulse aus Gebieten distal von der Durchschneidungsstelle ausgeschaltet wurden. Vor der Durchschneidung und danach wurde mit gleichbleibender gering überschwelliger Stromstärke gereizt. Änderungen der Spontanatmung sowie Hustenreaktionen wurden in der vorher beschriebenen Weise registriert.

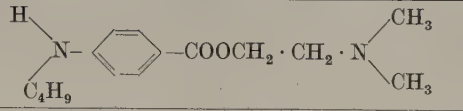
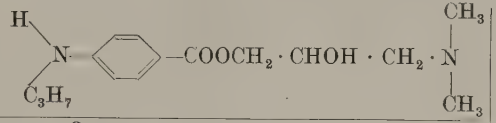
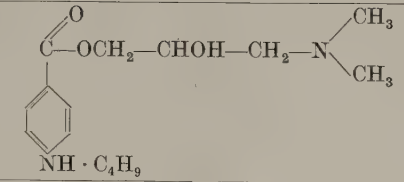
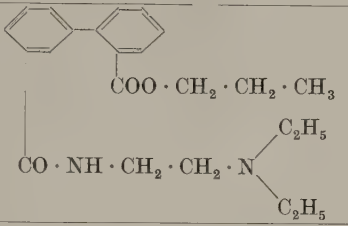
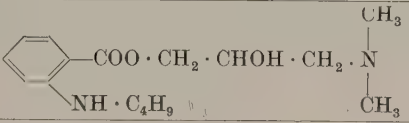
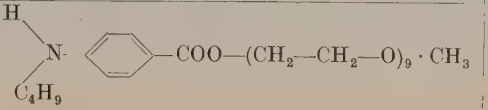
Zur Untersuchung gelangten die Substanzen „Pantocain", Hoechst 13059, Hoechst 7116, „Cornecain", (Abkömmlinge des „Pantocain") Hoechst 12564 und Hoechst 12147 und AGB. Die neu zu untersuchenden Substanzen Hoechst 13059, Hoechst 7116, Hoechst 12564, Hoechst 12147 und „Cornecain" wurden mit den in ihrer Wirkung auf die Dehnungsreceptoren bereits bekannten Substanzen Pantocain und AGB (Bucher, Zipf) verglichen. Die Verabfolgung der Substanzen erfolgte durch einmalige i.v. Injektion.

Bei den Substanzen handelt es sich um stark wirksame Lokalanaesthetica, deren oberflächenanaesthetische und leitungsanaesthetische Wirkung in der Größenordnung des Pantocain liegt. Während bei Hoechst 13059, Hoechst 12564, Hoechst 7116, Cornecain und dem Nona-Äthylen-glykolmonomethylester der 4-Butylaminobenzoesäure (AGB) die lokalanaesthetische Wirkung etwa gleich Pantocain ist, ist Hoechst 12147 erst in doppelter Konzentration etwa gleich wirksam wie dieses (Ther u. Lindner[14]) (Tabelle).

Ergebnisse

Die untersuchten Substanzen lassen sich in 3 Gruppen einteilen. Die einzelnen Gruppen umfassen Substanzen mit ähnlicher Wirkung.

1. Gruppe. Die hier zusammengefaßten Substanzen wirken auf beide untersuchten Receptorsysteme (Dehnungsreceptoren der Lunge des Meerschweinchens und Berührungsreceptoren der Trachea der Katze)

			Hustenstillende Wirkung an der Katze im Vergleich zu Pantocain	kleinste hustenstillende Dosis in mg/kg i.v.
1. Pantocain ®	p-Butylamino-benzoesäure-dimethyl-amino-äthanol-ester-hydrochlorid		1	0,25
2. Cornecain ®	p-Propylamino-benzoesäure-γ-dimethylamino-β-oxy-propyl-ester-chlorhydrat		1	0,25
3. Hoechst 7116	4-Butylaminobenzoesäure-γ-di-methylamino-β-oxy-propylester-chlorhydrat		1/8	2
4. Hoechst 12147	Diphenyl-2-carbonsäure-diäthylaminoäthylamid -2′-carbonsäure-butylester-chlorhydrat		1/16	4,0
5. Hoechst 12564	2-Butylaminobenzoesäure-dimethylamino-β-oxypropyl-ester-chlorhydrat		1/8	2,0
6. AGB	p-n-Butylaminobenzoesäure-nonaäthylenglykolmonomethyl-ester-chlorhydrat		1/4	1

und auf den Reizhusten der Katze schwellenerhöhend. Wir legen dem Vergleich der Substanzen die Dosis von 2 mg/kg zugrunde. Die Anaesthesie der Receptoren, die in allen Fällen durch i.v. Injektion erzielt wurde, bezeichnen wir mit Zipf als Endoanaesthesie. Die Stärke der Endoanaesthesie an beiden Receptorsystemen stimmt bei den 3 untersuchten Substanzen dieser Gruppe annähernd überein. Die Stärke der Wirkungen

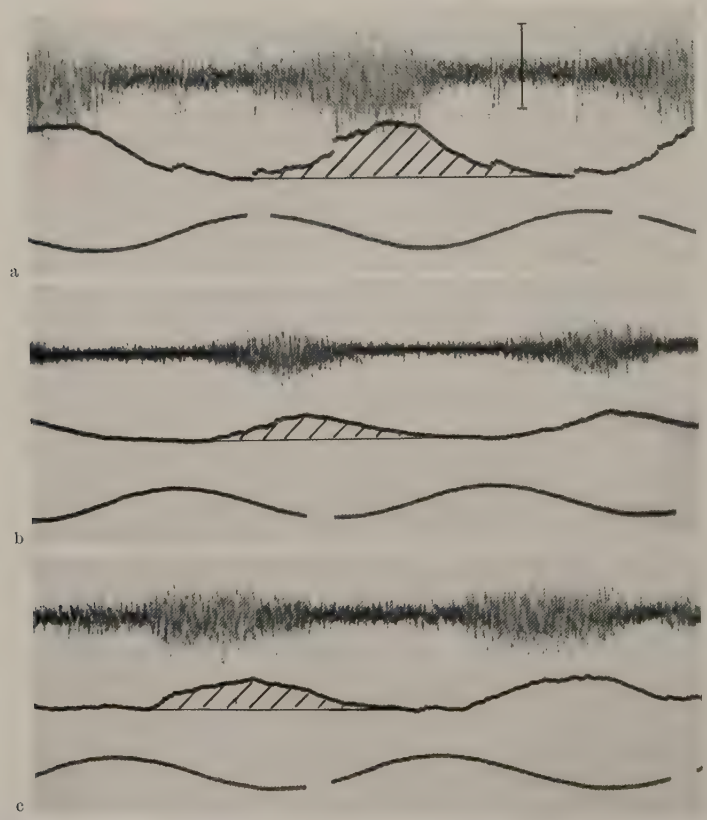


Abb. 1A. Meerschweinchen, 0,53 kg, Urethannarkose. Darstellung der Reaktion der Dehnungsreceptoren der Lunge auf 1 mg/kg AGB i.v. Ableitung der Impulse am Halsvagus. a Normalwerte, b Maximum der Reaktion 30 sec nach der Injektion, c 8 min später. Schraffierte Darstellung der vom Zeit-Spannungs-Integral umschlossenen Fläche. Eichspannung der Impulse 50 μV. Der die Atmung registrierende Strahl wird in Abständen von 1 sec unterbrochen

auf den Reizhusten der Katze zeigt jedoch keine quantitative Parallele zu dem Grad der Endoanaesthesie. In der gleichen geschilderten Versuchsanordnung vermindert z. B. AGB die Impulse beider Receptorsysteme stärker als Pantocain bzw. Cornecain. Dagegen ist eine dem Pantocain bzw. Cornecain entsprechende Wirkung auf den Reizhusten der Katze erst mit der 4fachen Dosis AGB zu erzielen. Zwischen Pantocain

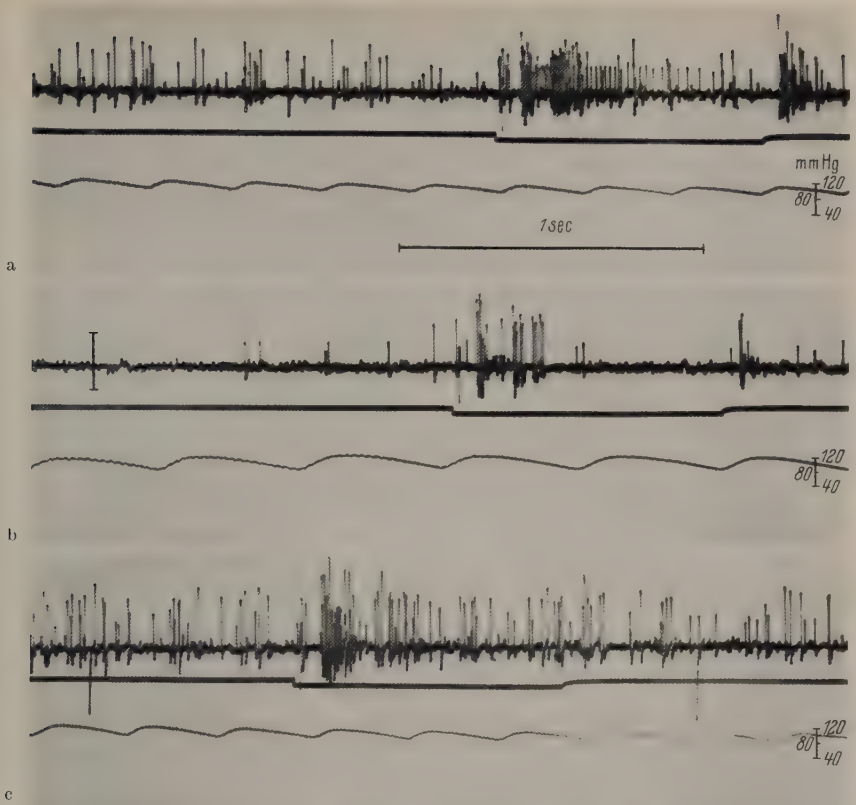


Abb. 1B. Katze, 2,7 kg, Narkose: Chloralose-Urethan. Darstellung der Reaktion der Berührungsreceptoren der Trachea auf 2 mg/kg AGB. Der zweite Strahl markiert Reiz und Reizdauer. Die Ableitung der Impulse erfolgte am N. laryngicus cran. a Normalwerte, b Maximum der Reaktion 30 sec nach der Injektion, c 10 min nach der Injektion. Eichspannung 50 μV

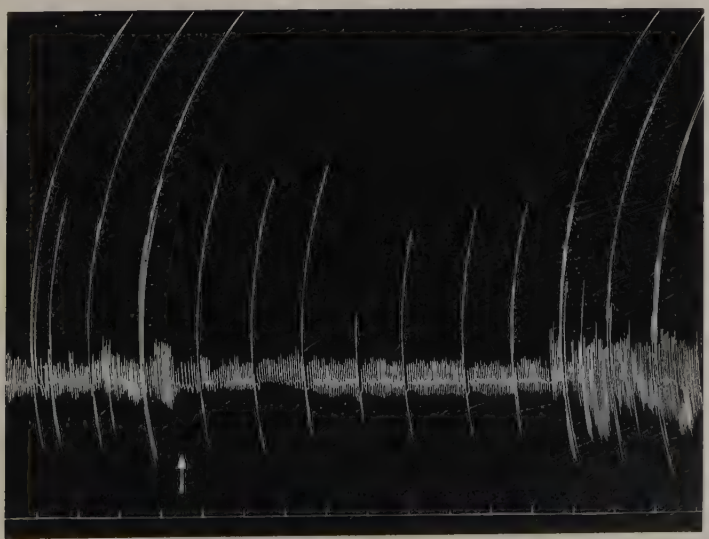


Abb. 1C. Katze, 1,7 kg, Pernoctonnarkose. Hustenversuch. Obere Kurve: Atmung und Hustenstöße. Untere Kurve: Zeit in Minuten. Bei ↑ wurde 1 mg/kg AGB i.v. gegeben

und Cornecain besteht in der Stärke der hustenstillenden Wirkung Übereinstimmung. Dagegen ist Cornecain erst in doppelter Dosis so stark endoanaesthetisch wirksam wie Pantocain. Die mangelnde Übereinstimmung erklärt sich aus der Vielfalt der Angriffsmöglichkeiten jeder Substanz. Vor allem muß an einen zusätzlichen, hier nicht untersuchten

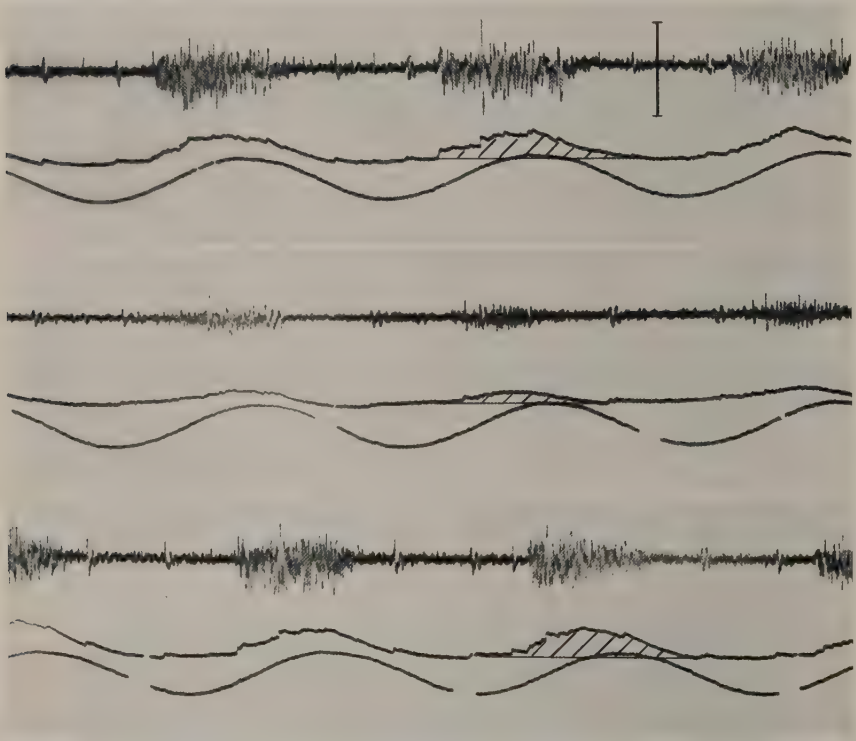


Abb. 2A. Meerschweinchen, 0,42 kg, Urethannarkose. Darstellung der Reaktion der Dehnungsreceptoren der Lunge auf 2 mg/kg Pantocain i.v. Ableitung der Impulse am Halsvagus. a Normalwerte, b 1 min nach der Injektion, c 20 min später. Die vom Zeit-Spannungs-Integral umschlossene Fläche ist schraffiert dargestellt, Eichspannung der Impulse 100 μV. Der die Atmung registrierende Strahl wird in Abständen von 1 sec unterbrochen

zentralen Wirkungsmechanismus gedacht werden. Die Ergebnisse im einzelnen sind:

AGB. Die geringste untersuchte Dosis beträgt 0,5 mg/kg. Die Wirkung auf den Reizhusten der Katze sowie die endoanaesthetische Wirkung sind inkonstant. Regelmäßige Wirkung ist mit 1 mg/kg zu erzielen (Abb. 1). Dabei entspricht die Zeitdauer der Endoanaesthesie der Dauer der Hustenstillung (etwa 10 min). Die Receptoraktivität wird auf etwa 65% des Ausgangswertes gesenkt. Dieses Maximum der Wirkung wird nach etwa 30 sec erreicht. Die Dosis von 2 mg/kg senkt die Zahl der Impulse beider Receptorsysteme auf etwa 30% des Ausgangswertes. Die Dauer der Wirkung ist etwa 20 min. Die hustenstillende Wirkung erstreckt sich etwa über den gleichen Zeitraum. Eine Tachyphylaxie macht zur Erzielung des gleichen

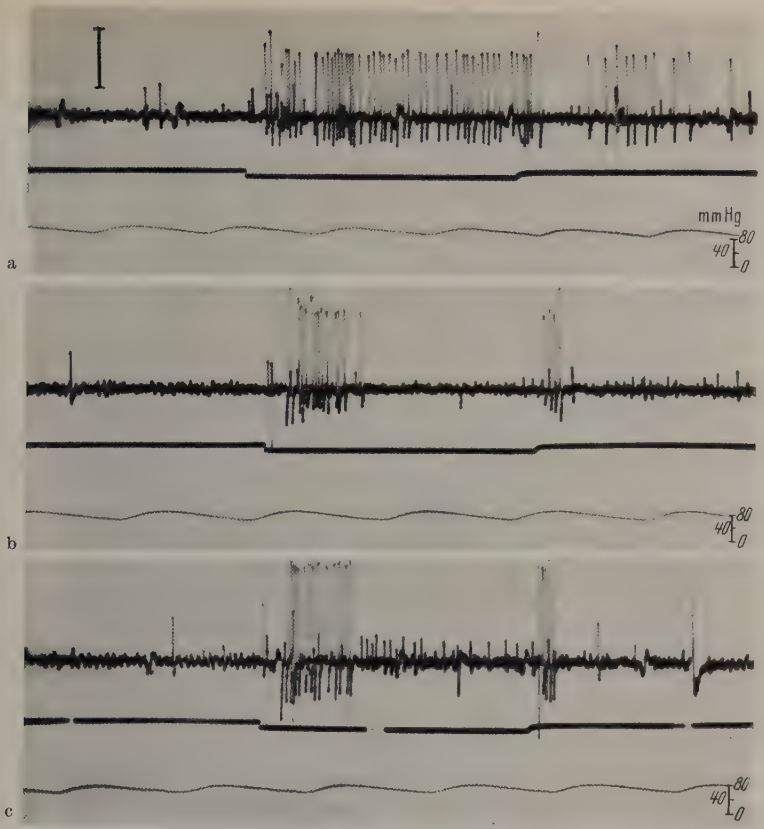


Abb. 2B. Katze, 2,8 kg, Narkose: Chloralose-Urethan. Darstellung der Reaktion der Berührungsreceptoren der Trachea auf 2 mg/kg Pantocain. Der zweite Strahl markiert die Reizung mit der Borste. Ableitung der Impulse am N. laryngicus cran. a Normalwerte, b Maximum der Reaktion 30 sec nach der Injektion, c 15 min später. Eichspannung 50 μV

Abb. 2C. Katze, 2,3 kg, Pernoctonnarkose. Hustenversuch. Obere Kurve: Atmung und Hustenstöße. Untere Kurve: Zeit in Minuten. Bei ↑ wurden 0,25 mg/kg „Pantocain" i.v. gegeben

Effektes bei wiederholter Injektion höhere Dosen notwendig. AGB wirkt außerdem auf Kreislauf und Atmung. Es führt in der Dosis von 2 mg/kg zu Blutdruckabfall mit Bradykardie (manchmal mit Pulsus bigeminus) und vorübergehendem Atemstillstand. Zwei der spontanatmenden Katzen mit primär niedrigem Blutdruck kamen durch die genannte Dosis ad exitum. Bei einem Tier führten 3 mg/kg zu einem völligen Stop der Atmung über 4 min. Die Rückkehr zur Normalatmung erfolgte nach 10 min. Diese Zeit stimmt annähernd überein mit der Dauer der endoanaesthetischen Wirkung auf die Dehnungsreceptoren der Lunge der Meerschweinchen.

Pantocain (Abb. 2). Es wirkt mit 0,25—0,5 mg/kg bereits hustenstillend. Die Wirkung erstreckt sich über etwa 25 min. Damit ist seine Schwellendosis vier mal kleiner als die des AGB. Die genannte Dosis hat aber keinen Einfluß auf die Receptoren beider Systeme. Mit einem Maximum der Wirkung nach 1 min vermindern 2 mg/kg Pantocain die Zahl der Impulse aus den Dehnungsreceptoren der Lunge deutlich, so daß die Fläche des Zeit-Spannungsintegrals der Potentialschwankungen der jeweiligen „Potentialspindeln" um 60% auf maximal 40% des Ausgangswertes gesenkt wird. Der Senkung der Receptoraktivität über etwa 20 min steht eine wesentlich längere Wirkung auf den Reizhusten der Katze gegenüber. Bei fünf der Tiere reagierten die Potentialspindeln weniger stark. Bei ihnen wurde die Grenze einer 50%igen Hemmung nicht überschritten. Die Verminderung der Impulse der Berührungsreceptoren führte auf 40% des Ausgangswertes. Die genannte Dosis läßt Kreislauf und Atmung unbeeinflußt. Um die Pantocainwirkung an den Dehnungsreceptoren deutlich zu machen, wurden in einigen Fällen nach Pantocain 30 γ/kg Veratrin injiziert. Die am Normaltier stets gefundene Dauerentladung der Dehnungsreceptoren nach Veratrin blieb aus (siehe auch Zipf u. Kreppel[20]). Es fand sich wie in den Untersuchungen von Zipf an anderen Substanzen mit ähnlicher Wirkung ein Wegfall der Veratrindauerentladung.

Cornecain. Die Substanz wirkt auf den Reizhusten der Katze etwa gleich stark wie Pantocain. Die geringste hustenstillende Dosis von 0,25—0,5 mg/kg zeigt keinerlei Beeinflussung der Zahl der Receptorpotentiale. Um die einer Dosis von 2 mg/kg Pantocain entsprechende Wirkung auf die Receptorenaktivität der Dehnungs- und der Berührungsreceptoren zu erzielen, sind 3—4 mg/kg Cornecain notwendig. Tiere mit Spontanatmung vertragen diese Dosis nicht, da die Substanz Kreislauf und Atmung beeinflußt.

2. Gruppe. Zu dieser Gruppe gehört nur die Substanz Hoechst 13059. Sie ist stark hustenstillend wirksam (0,25—0,5 mg/kg i.v.), doch fehlt ihr eine endoanaesthetische Wirkung fast völlig. Chemisch gehört die Substanz zur Pantocainreihe, wie das AGB.

Die hustenstillende Wirkung entspricht der einer gleichen Dosis Pantocain bzw. Cornecain. Am Meerschweinchen prüften wir Dosen bis zu 4 mg/kg. Es fand sich keinerlei Beeinflussung der Impulse der Dehnungsreceptoren der Lunge. Die Wirkung auf die Receptoren der Trachea der Katze ist gering. Sie liegt mit einer Senkung der Spontan- und Reizaktivität auf 75% des Ausgangswertes und einer Wirkungsdauer von einigen Minuten weit hinter der Wirkung aller vorgenannten Substanzen.

3. Gruppe. Den Substanzen dieser Gruppe (Hoechst 7116, Hoechst 12564 und Hoechst 12147) ist gemeinsam eine geringe Wirkung auf den Reizhusten der Katze. Die Wirkung auf die Receptorenaktivität ist

ebenfalls gering bzw. fehlt überhaupt. Auch hier fehlt eine quantitative Übereinstimmung zwischen dem Grad der Hustenstillung und der endoanaesthetischen Wirkung.

Die Ergebnisse im einzelnen

Bei Hoechst 7116 brauchten wir, um den Effekt einer Pantocaindosis beim Husten nachzuahmen, eine 8fach höhere Menge. Gleiche Dosen von Pantocain und Hoechst 7116 zeigten jedoch bei Hoechst 7116 nur 40%

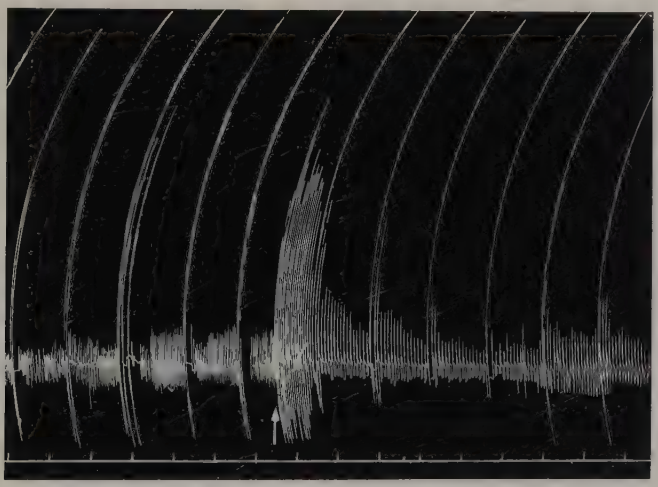


Abb. 3. Katze, 2,7 kg, Pernoctonnarkose. Obere Kurve: Registrierung der Atmung und der Hustenstöße aus der Trachea. Untere Kurve: Zeit in Minuten. Bei ↑ wurden beide Vagi durchschnitten

der Hemmung der Receptorenaktivität wie sie das Pantocain hervorruft. 2 mg/kg führten bei 2 Tieren ad exitum. Diese Dosis, die in anderen Fällen trotz vorübergehender Blutdrucksenkung und Atemhemmung vertragen wurde, senkte die Spontan- und Reizaktivität der Berührungsreceptoren auf 65% des Ausgangswertes. Den gleichen Grad einer Hemmung fanden wir bei den Dehnungsreceptoren. Die höchste geprüfte Dosis von 4 mg/kg — immerhin die doppelte an der Katze hustenstillend wirkende Dosis — führte zu einer Verminderung des Flächenintegrales der Potentialschwankungen der Dehnungsreceptoren auf 50% des Ausgangswertes. Die Wirkungsdauer betrug 30 min. Diese Dosis konnte bei Spontanatmung nicht gegeben werden, da sie Kreislauf und Atmung stark beeinflußt. Hoechst 12564 wirkte ebenfalls in 8facher Dosis gleichstark wie Pantocain auf den Reizhusten der Katze. Die Dehnungsreceptoren blieben von den untersuchten Dosen (bis 4 mg/kg) unbeeinflußt. 2 mg/kg senkten die Aktivität der Larynxreceptoren auf 80% des Ausgangswertes. Hoechst 12147 war beim Reizhusten der Katze mit der

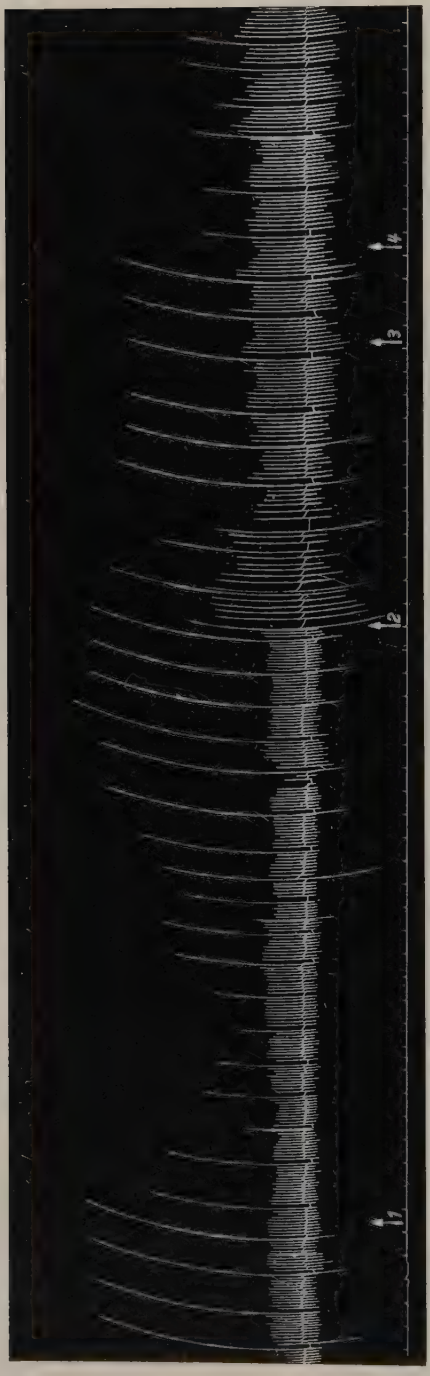


Abb. 4. Katze, 2,3 kg. Pernoctonnarkose. Hustenversuch. Obere Kurve: Atmung und Hustenstöße. Untere Kurve: Zeit in Minuten. Es wurden bei ↑1 0,25 mg/kg 13059 i.v. gegeben, bei ↑2 beide Vagi durchschnitten, bei ↑3 0,25 mg/kg 13059 i.v. gegeben, bei ↑4 0,25 mg/kg 13059 i.v. gegeben

16fachen Dosis ebenso wirksam wie Pantocain. Dosen bis zu 4 mg/kg beeinflußten die Receptorenpotentiale nicht.

Die wichtige Rolle, die die Dehnungsreceptoren bei der Regelung der Atemtiefe spielen, ist deutlich bei der Katze zu demonstrieren, wenn man die Atmung vor und nach beiderseitiger Vagusdurchschneidung registriert (Abb. 3). Die Inspirationist bedeutend vertieft und auch verlangsamt. Durch die Vagusdurchschneidung werden nach Widdicombe u. Mitarb. die afferenten Impulse aus den Dehnungsreceptoren völlig ausgeschaltet[4]. Um den Einfluß des Wegfalls der Impulse aus den Dehnungsreceptoren auf den Hustenreflex zu prüfen, wurden bei 11 Katzen in Pernoctonnarkose die Vagi beiderseitig peripher von der Einmündungsstelle der Nervi laryngici craniales durchschnitten. Vor und nach der Vagusdurchschneidung wurden die Nervi laryngici craniales mit der gleichen gering überschwelligen Stromstärke gereizt und die Hustenstöße aufgezeichnet. In 6 dieser 11 Versuche zeigte sich keine Abnahme der Hustenstärke; in einem Versuch trat eine Abnahme um 9%, in einem weiteren Versuch

um 12% und in 2 Versuchen um 17% ein. In einzelnen dieser Fälle wurde der Versuch noch längere Zeit weitergeführt. Es kam dann zu einem Wiederansteigen der gering abgefallenen Hustenintensitäten. Wenn die Dehnungsreceptoren nicht nur bei der Atmung, sondern auch beim Zustandekommen des Hustens eine wesentliche Rolle spielten, müßte es aber nach Vagusdurchschneidung (peripher von der Einmündung der gereizten N. laryng. cran.) zu einer bedeutenden Abnahme der Stärke des Hustens kommen. Dies ist aber bei der Katze nicht der Fall. Auch die zur Hustenstillung notwendige Dosis der einzelnen Präparate wurde

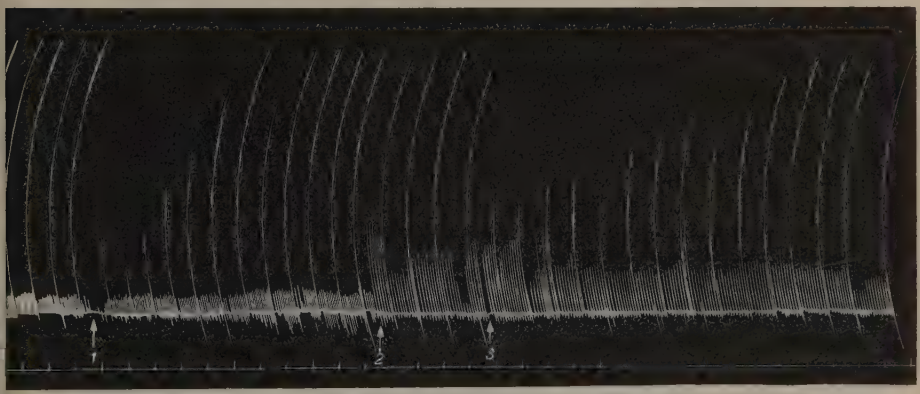


Abb. 5. Katze in Pernoctonnarkose. Bei *1* wurde 1 mg/kg AGB i.v. injiziert. Bei *2* wurden die Vagi durchschnitten. Bei *3* wurde 1 mg/kg AGB i.v. injiziert

durch die Vagusdurchschneidung nicht beeinflußt (Abb. 4 u. 5). Scheinbare Abnahmen der Wirkungsstärke sind durch die einzelnen Präparaten eigene Tachyphylaxie bedingt. Sie treten also in dem gleichen Maße bei Tieren mit undurchschnittenen Vagi auf.

Diskussion

Eine Übereinstimmung zwischen der Stärke der hustenstillenden Wirkung und dem Grad der Endoanaesthesie fehlt in der Reihe der hier untersuchten stark lokalanaesthetisch wirkenden Substanzen. Die Substanzen mit der stärksten endoanaesthetischen Wirkung — AGB und Pantocain — unterscheiden sich in der Stärke ihrer hustenstillenden Wirkung erheblich, wobei das eher schwächer endoanaesthetisch wirkende Pantocain etwa 4mal stärker hustenstillend wirkt als AGB. Außerdem muß die Anaesthesie der Berührungsreceptoren zumindest mit als Ursache für die hustenstillende Wirkung des AGB angesehen werden. Das deutlich schwächer endoanaesthetisch als AGB und Pantocain wirkende Cornecain ist trotzdem gleich hustenstillend wirksam wie Pantocain. Hoechst 13059, das derselben chemischen Klasse angehört

wie die vorstehenden Substanzen, beeinflußt die Receptoren beider Systeme kaum, hat aber eine gleichstarke hustenstillende Wirkung wie Pantocain. Bei den anderen hier abgehandelten stark wirksamen Lokalanaesthetica geht die relativ schwache hustenstillende Wirkung mit einer nur mäßigen (Hoechst 7116) oder keiner wesentlichen Beeinflussung der Dehnungs- und Berührungsreceptoren einher. Die Untersuchungen an Katzen mit durchschnittenen Vagi lassen die Rolle der Dehnungsreceptoren bei der Entstehung des Hustens unwichtig erscheinen. Der Hustenstoß wird durch den Wegfall sämtlicher afferenter Impulse aus den Dehnungsreceptoren durch die Vagusdurchschneidung peripher von der Einmündungsstelle der gereizten N. laryngici craniales nicht wesentlich vermindert. Die Wirkung von AGB, Pantocain, Hoechst 13059 auf diesen durch elektrische Reizung des N. laryngicus cranialis erzielten Hustenstoß der Katze bleibt unverändert. Auch Widdicombe[5,6] weist der Erregung der Lungendehnungsreceptoren anscheinend keinen besonderen Platz in der Hustengenese zu, wenn er im Gegensatz zu Bucher u. Jacot darauf hinweist, daß nach seinen Untersuchungen der Husten meist mit einer Exspiration beginnt.

Bucher führt als Hauptargument für die Bedeutung der Dehnungsreceptoren beim Hustenreflex neben seinen elektrophysiologischen Untersuchungen am Lungenvagus, seine Versuche an Katzen mit Pleurakanüle und Atmung in den Pleuraraum an[2]. Durch den Wegfall der Lungendehnung bei Öffnung der Pleurakanäle während der Inspiration sind die Dehnungsreceptoren ausgeschaltet. Es erfolgt bei Reizung mit Seifenpulver an der Bifurkatio der Trachea kein Hustenstoß. Ein Ventilmechanismus an der Pleurakanüle verhinderte dabei den Luftaustritt aus der Pleurahöhle während der Exspiration. Dies führte zu einem bei jeder Inspirationsbewegung zunehmenden Luftvolumen im Pleuraraum. Während der Exspiration konnte die Luft nicht entweichen. Die Thoraxmuskulatur befand sich unter einer dauernden erhöhten Spannung. Dies mußte zu einer veränderten Proprioceptivität aus den Muskelspindeln der Thoraxmuskeln führen, die durchaus als Ursache für die Störung des Reflexablaufes beim Husten in Frage kommt. Die Bedeutung der Proprioceptivität aus den Muskelspindeln für den Ablauf des Hustenreflexes ist zwar unseres Wissens noch nicht im einzelnen untersucht, sie muß jedoch als gegeben angenommen werden, wenn man ihre Bedeutung bei der Atmung berücksichtigt[7,9,12]. Die Bedeutung der Bucherschen Ergebnisse wird noch dadurch unsicher, daß er als Reizsubstanz zur Erzeugung des Hustens Seifenpulver verwandte, das er in die Trachea einblies. Es ist möglich, daß das Liegenbleiben des Reizstoffes auf den Receptoren bei fehlendem Luftstrom zu einer Adaptation der Receptoren und damit zum Aufhören des Hustenreizes führt. Weiser[15] glaubte diesem Einwand dadurch begegnen zu können, daß er

den Husten bei inspiratorischem Trachealverschluß untersuchte. Er fand, daß der Husten bei gleichbleibender Reizstärke nach dem Verschluß der Trachea unvermindert weiter besteht bzw. sogar verstärkt abläuft, obwohl nach seiner Meinung bei seiner Versuchsanordnung eine Luftbewegung in der Trachea ausgeschlossen ist. Nach den Untersuchungen von Wick[16] tritt aber bei der Inspiration eine erhebliche Erweiterung, bei der Exspiration eine Verengerung der Bronchialwege ein. Außerdem führt die beim Trachealverschluß verstärkte Ex- bzw. Inspirationsbemühung zu einer Verlagerung aller Thoraxorgane und damit auch des Bronchialbaumes. Hierbei muß es wohl zu einer Luftbewegung in der Trachea, erheblichen Dislokationen der Atemwege und damit zu einer Bewegung der Reizsubstanz kommen. Die geschilderten Überlegungen lassen uns die Befunde von Bucher und seinen Mitarbeitern als Argumente für die Bedeutung der Dehnungsreceptoren beim Zustandekommen des Hustenreflexes nicht ausreichend erscheinen.

Wir glauben daher sagen zu können, daß bei den von uns untersuchten hustenstillend wirkenden Lokalanaesthetica zentrale Wirkungsmechanismen im Vordergrund stehen, während die Wirkungen auf die Receptoren der Trachea und die Dehnungsreceptoren der Lunge nur von untergeordneter Bedeutung sein dürften.

Zusammenfassung

Bei einer Anzahl von stark wirkenden Lokalanaesthetica, von denen der überwiegende Teil der „Pantocain"-Reihe angehört, wurde die Stärke der Anaesthesie der Dehnungsreceptoren der Lunge und der Berührungsreceptoren der Trachea untersucht und mit der hustenstillenden Wirkung verglichen.

Es konnte keine Beziehung zwischen der Stärke der endoanaesthetischen Wirkung und der Stärke der hustenstillenden Wirkung gefunden werden.

Der Nona-Äthylen-glykolmonomethylester der 4-Butylaminobenzoesäure (AGB) hat bei i.v. Injektion neben einer die Dehnungsreceptoren anaesthesierenden Wirkung auch eine etwa gleich starke anaesthesierende Wirkung auf die Berührungsreceptoren der Trachea. Dies muß bei der Deutung der Hustenstillung mit berücksichtigt werden.

Beiderseitige Vagusdurchschneidung bei der Katze, die die Dehnungsreceptoren ausschaltet, führt zu keiner wesentlichen Verminderung des Reizerfolges bei der cranial von der Durchschneidungsstelle durchgeführten elektrischen beiderseitigen Reizung der Nervi laryngici craniales. Die zur Hustenstillung notwendige Dosis der hustendämpfenden Lokalanaesthetica ist vor und nach der Vagusdurchschneidung gleich groß. Dies spricht gegen einen wesentlichen Einfluß der Dehnungsreceptoren auf den Hustenablauf und der Dehnungsreceptorenanaesthesie für die Hustenstillung.

Literatur

[1] Bucher, K.: Schweiz. med. Wschr. **1956**, 94.
[2] Bucher, K., and C. Jacot: Helv. physiol. pharmacol. Acta **9**, 454 (1951).
[3] Bein, H. J., and K. Bucher: Helv. physiol. pharmacol. Acta **15**, 55 (1957).
[4] Dawes, G. S., J. C. Mott and J. G. Widdicombe: J. Physiol. (Lond.) **115**, 258 (1951).
[5] Widdicombe, J. G.: J. Physiol. (Lond.) **123**, 55 (1954).
[6] Widdicombe, J. G.: J. Physiol. (Lond.) **123**, 71 (1954).
[7] Fleisch, A.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **223**, 509 (1929).
[8] Göpfert, H., u. H. Jahn: Naturwissenschaften **1957**, 38.
[9] Hess, W. R.: Regulierung der Atmung. Leipzig: Georg Thieme-Verlag 1931.
[10] Kroepfli, P.: Helv. physiol. pharmacol. Acta 8, 33 (1950).
[11] Müller, B.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, 137 (1954).
[12] Pike, F. H., and H. C. Coombs: Amer. J. Physiol. **59**, 472 (1922).
[13] Schröder, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **212**, 433 (1951).
[14] Ther, L., u. E. Lindner: Medizin u. Chemie Bd. 6 (im Druck).
[15] Weisser, K.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 55 (1953).
[16] Wick, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 52 (1952).
[17] Zipf, H. F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **218**, 113 (1953).
[18] Zipf, H. F.: Klin. Wschr. **1953**, 97.
[19] Zipf, H. F.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1587.
[20] Zipf, H. F., and F. Kreppel: Helv. physiol. pharmacol. Acta **226**, 340 (1955).
[21] Zipf, H. F., u. H. Oehler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **226**, 363 (1955).
[22] Zipf, H. F., u. F. Reichertz: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 96 (1957).

Dr. Richard Sell, Dr. H. Jahn, Physiologisches Institut der Universität Heidelberg,
Dr. E. Lindner, Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt/Main-Höchst,
Pharmakologisches Labor

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 179—184 (1958)

Aus der Med. Univ. Poliklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hartmann)

Der Einfluß ungesättigter langkettiger und gesättigter mittelkettiger Fettsäuren auf den Fettgehalt der Rattenleber bei cholinfreier Kost

Von
Fritz Hartmann und Klaus Zehender

(Eingegangen am 6. Februar 1958)

Auf der Suche nach geeigneten Diätfetten für Kranke mit Fettstoffwechselstörungen wie Fettleber, Fettcirrhose, Arteriosklerose, Diabetes mellitus und essentiellen Hyperlipämien hat sich das Interesse in den letzten Jahren auf die Gruppe der ungesättigten und mittelkettigen Fettsäuren konzentriert. Man erwartet von ihnen entweder, daß sie die Fettverteilung im Blut beeinflussen oder selbst nicht depotfähig sind, in jedem Falle aber der pathologischen Ablagerung von Lipiden, z. B. in der Leber oder den Arterienwänden entgegenwirken.

Die Unentbehrlichkeit der ungesättigten Fettsäuren beruht darauf, daß der Organismus sie nicht selbst aufbauen oder nur gesättigte Fettsäuren bilden kann[4]. Jedoch können sie in andere ungesättigte Fettsäuren (z. B. Linol- und Linolensäure in Arachidonsäure) oder in gesättigte Fettsäuren überführt werden[18]. Ihre Stellung im Fettstoffwechsel ergibt sich daraus, daß mindestens eine der beiden Fettsäuren der Phospholipide, z. B. des Lecithin, eine ungesättigte sein muß[23]. Aus der Jodzahl der Phospholipide muß man außerdem auf einen hohen Gehalt an mehr als einfach ungesättigten Fettsäuren schließen. Auch das Serumcholesterin ist vornehmlich mit ungesättigten Fettsäuren verestert[8].

Bei Mangel an ungesättigten Fettsäuren kommt es zu einer Anhäufung von Cholesterinestern in der Leber bei Abfall des Cholesterin im Blut[2].

Untersuchungen mit Fetten und Ölen, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind, haben gezeigt, daß die Höhe des Serumcholesterin- und Phospholipidspiegels sich umgekehrt wie die Jodzahlen der Diätfette verhalten[1]. So lassen sich durch Leinöl die Serumspiegel für Cholesterin, Neutralfette und Phospholipide senken[5,7]. Nach einmaliger Belastung mit Leinöl ist die alimentäre Hyperlipämie nicht so hoch wie nach Belastung mit langkettigen gesättigten Fettsäuren und zeigt eine starke negative Nachschwankung[9,21].

Diese Befunde weisen auf eine Schlüsselstellung der ungesättigten Fettsäuren im Fettsäureabbau, in der Verwertung der Triglyceride, der Phospholipidsynthese und dem Cholesterinstoffwechsel hin.

Die Rolle der mittelkettigen gesättigten Fettsäuren im Stoffwechsel wird durch die Tatsache beleuchtet, daß man nach einmaliger Zufuhr eine alimentäre Hyperlipämie vermißt[9] und daß sie im Unterschied zu langkettigen Fettsäuren nicht über den Ductus thoracius, sondern die Pfortader geleitet werden[6,16]. Es scheint also, daß sie in der Leber schnell verbrannt werden. Tatsächlich konnten Kennedy u. Lehninger[14,15] nachweisen, daß Lebermitochondrien und Leberschnitte aus kurzkettigen Fettsäuren schneller Acetessigsäure bilden als aus langkettigen. Die Meinung, daß sie nicht depotfähig seien, ist aber nicht richtig. Vielmehr werden sie in langkettige Fettsäuren zu 90% umgebaut[22]. Nur ein kleiner Teil findet sich im Depotfett und von C_{10} an auch im Hautfett. Im Leberfett der Cholinmangelfettleber treten mit dem Futter zugeführte Octan-, Decan- und Dodecansäure, wenn überhaupt, dann nur in Spuren auf[25].

In den Versuchen Weitzels mit Laboratoriums-Reinzuchtratten trat bei Fütterung von Triglyceriden mittelkettiger Fettsäuren auch im Cholinmangel keine Leberverfettung auf[26]. Das schien darauf hinzuweisen, daß diese Fettsäuren nicht nur nicht deponiert werden, sondern auch die unter diesen Bedingungen auftretende Ablagerung von Triglyceriden mit Fettsäuren großer Kettenlänge verhindern, also lipotrop wirken würden. Parallelversuche an Sprague-Dawley-Ratten führten jedoch zu hochgradigen Fettlebern, die allerdings nur wenige Prozent mittelkettiger Fettsäuren enthielten. Der Grad der Verfettung entsprach dem bei Zufütterung entsprechender Mengen von Olivenöl. Die mittelkettigen Fettsäuren wurden also in langkettige umgewandelt und als solche deponiert.

Die vorliegenden Versuche wurden durchgeführt, um einen lipotropen Effekt der ungesättigten Fettsäuren nachzuweisen, nachdem bei Mangel an diesen Fettsäuren Leberverfettung beobachtet wurde. Durch Bestimmung der Lipidfraktionen, vor allem der Neutralfette und Phospholipide, versprachen wir uns einen Einblick in den Wirkungsmechanismus. Die mittelkettigen Fettsäuren wurden am Cholinmangeltier untersucht, um Zweifel an ihrer Stellung im Mechanismus der Leberverfettung zu beseitigen, bevor man ihre Triglyceride unter Umständen als Diätfett bei Fettlebern oder Lebercirrhose empfiehlt.

Als solches wären sie nur geeignet, wenn sie eine Fettleber verhindern könnten.

Methodik

Für die Versuche wurden 75 männliche weiße Laboratoriumsratten von etwa 120 g verwendet. Sie wurden 14 Tage mit einer Cholinmangelkost auf Glucose-Casein-Basis ernährt. 15 Tiere dienten als Kontrolle. 10 Tiere erhielten nur die Mangelkost, 10 Tiere Mangelkost und Margarine täglich, als Vertreter eines Triglycerids aus langkettigen gesättigten Fettsäuren. 10 Tiere erhielten zur Mangelkost 2 g eines Mischglycerids, aus Capryl-Caprin-Laurinsäure, also der Fettsäuren der Kettenlängen C_8—C_{12} und weitere 10 Tiere 2 g eines Gemisches aus Linol- und Linolensäure. Nach 14 Tagen wurden alle Tiere getötet und in der Leber säulenchromatographisch Neutralfette, Phosphatide, Kohlenwasserstoffe und Wachse, Cholesterin, Cholesterinester und freie Fettsäuren bestimmt[20].

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt. Sie beschränkt sich auf die Werte für Gesamtlipide, Neutralfette und Phosphatide. Von den übrigen Fraktionen zeigten nur die Cholesterinester ein bemerkenswertes Verhalten: Sie stiegen bei der Mangelkostverfettung von normal 13,8% der Gesamtlipide auf 21,3% und sanken bei Zugabe von Linol-Linolensäure zur Kost auf 5,8%.

Tabelle

Art der Ernährung	Zahl der Tiere	Gesamtlipide in mg/g Trockensubstanz	Phosphatide	Triglyceride
			in mg/g Trockensubstanz	
Normalkost	14	205 ± 19,8	94 ± 5,4	49 ± 10,3
Cholinmangelkost	10	225 ± 24,6	81 ± 6,1	53 ± 7,3
Cholinmangelkost + Margarine	10	217 ± 18,2	101 ± 1,34	53 ± 7,3
Cholinmangelkost + Mischglycerid	17	256 ± 21,7	84 ± 6,85	107 ± 25,4
Cholinmangelkost + Linol-Linolensäure	7	191 ± 23,6	103 ± 8,65	29 ± 13,8

Die Werte der Tabelle zeigen zunächst die Zunahme der Gesamtlipide ($p = 0{,}9$) und Neutralfette ($p = 0{,}4$) und die Abnahme der Phosphatide ($p = 0{,}1$) während der Verfettung. Zugabe von Margarine erhöht vor allem den Phosphatidgehalt ($p = 0{,}025$). Die Mischglyceride verstärken das Bild der Leberverfettung durch Steigerung des Triglyceridgehaltes ($p = 0{,}2$). Die ungesättigten Fettsäuren senken vor allem den Neutralfettspiegel ($p = 0{,}1$). Die Gesamtlipide sind nicht so stark erniedrigt ($p = 0{,}3$). Das kommt durch die relative Erhöhung der Phosphatide ($p = 0{,}05$). Ein Teil der Neutralfette ist bereits in Phosphatide umgewandelt. Die statistische Sicherung der Ergebnisse ist schwierig, da diese aus drei Würfen des gleichen Rattenstammes gewonnen sind und die einzelnen Würfe unterschiedliche Normalwerte aufweisen. Innerhalb der einzelnen Würfe sind die Schwankungen geringer, die pathologischen Veränderungen und die therapeutischen Erfolge überzeugender.

Besprechung der Ergebnisse

Die ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure haben unter der Bedingung einer Cholinmangelkost eine unerwartet starke lipotrope Wirkung gezeigt. Sie senken den unter dieser Diätbedingung gesteigerten Gesamtlipid- und vor allem den Triglyceridgehalt der Rattenleber und normalisieren deren Phosphatidgehalt. Nach den Erfahrungen früherer Experimente über den Wirkungsmechanismus lipotroper Substanzen, vor allem mit P^{32}, beudeutet das wahrscheinlich Aktivierung der Phosphatidsynthese und Abbau der Triglyceride über die Phospholipide zu den Fettsäuren. Eine Reihe von Tatsachen macht es wahrscheinlich,

daß die ungesättigten Fettsäuren an der Phosphatidsynthese essentiell beteiligt sind. Einmal sind sie notwendiger Bestandteil der Phosphatide. Vor allem muß aber die Diglyceridvorstufe der Phosphatide eine ungesättigte Fettsäure enthalten[14]. Es hat den Anschein, daß diese Konstitution Vorbedingung für den Angriff des synthetisierenden Enzymsystems ist. Im Mangelzustand an essentiellen Fettsäuren findet eine Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung statt[17,24]. Ein solcher Mangelzustand scheint auch nach langfristiger starker Zufuhr gesättigter Fettsäuren aufzutreten[12]. Bei Mangel an essentiellen Fettsäuren kommt es zur Leberverfettung[3]. Die Bildung von Lecithin in der Darmwand, also die Phosphorylierung der Neutralfette während der Darmresorption ist erniedrigt[11]. Deuel hat deswegen eine Blockade des Fettstoffwechsels infolge mangelnder Phospholipidsynthese angenommen. In der Deutung der vorliegenden Befunde möchten wir uns dieser Meinung anschließen und die Erklärung des lipotropen Effekts der ungesättigten Fettsäuren in ihrer Bedeutung für die Phospholipidsynthese in der Leber suchen. Jedoch beruht diese Wirkung nicht nur auf ihrer notwendigen Anwesenheit im Phosphatidmolekül, sondern auch darin, daß sie notwendiger Bestandteil von Enzymen sind, die wie die Lipoxydase und Cytochromoxydase an der Fettsäureoxydation beteiligt sind[13,27]. Ihre Wirkung können sie in dem angesprochenen Sinne nur entfalten, wenn sie unoxydiert bleiben.

Den früher nachgewiesenen lipotropen Effekt des Vitamin E deuten wir deswegen zum Teil als Wirkung auf die ungesättigten Fettsäuren im Sinne eines Antioxydans. Die vorliegenden Versuche zeigen aber auch, daß der Cholinmangel durch ungesättigte Fettsäuren nicht vollkommen ausgeglichen werden kann. Das ist auch nicht zu erwarten; denn beide Substanzen sind essentielle Bestanteile des Lecithin. Man muß aber berücksichtigen, daß die benutzte Mangelkost auch keine essentiellen Fettsäuren enthält und aus Kohlenhydraten als Energiequelle nur gesättigte Fettsäuren aufgebaut werden können. Der endgültige Beweis für die zur Deutung der vorliegenden Versuchsergebnisse entwickelten Vorstellung kann nur auf Grund eines Nachweises gesteigerter Fettsäureoxydation in den verfetteten Lebern erbracht werden. Er würde auch für diesen Fall, wie es für Cholin bereits geschehen ist, die Phosphatidsynthese als Vorstufe der Fettsäureoxydation erscheinen lassen. Die Auffassung, daß Triglyceride über die Phosphatidstufe verwertet werden, erhält durch unsere Ergebnisse eine neue Stütze.

Die Senkung des Cholesteringehaltes der Fettleber ergänzt die Befunde über Cholesterinanhäufung in der Leber von Tieren mit Mangel an essentiellen Fettsäuren und unterstreicht die Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren für den Cholesterintransport[19]. Für eine endgültige Aussage sind aber gleichzeitige Blutcholesterinbestimmungen notwendig.

Die vergleichenden Untersuchungen mit Margarine und Mischglycerid haben keinen Anhaltspunkt für eine Sonderstellung der Triglyceride mit mittelkettigen Fettsäuren im Fettstoffwechsel der Leber ergeben. Sie sind offenbar zu Triglyceriden mit langkettigen Fettsäuren synthetisiert und als solche deponiert worden. Sie werden wahrscheinlich nicht bevorzugt oxydiert, wenn die Gesamtstoffwechsellage nicht gerade auf Energiegewinnung aus Fett eingestellt ist. Ob dann Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit bestehen, müssen Versuche an kalorisch unterernährten Mangelkostratten erweisen. Das Fehlen der alimentären Hyperlipämie nach Mischglyceridgabe muß man wohl so erklären, daß die über die Pfortader der Leber zuströmenden mittelkettigen Fettsäuren dort abgefangen und zu langkettigen gemacht werden. Deren Abgabe ins Blut erfolgt dann langsam und später als der Einstrom von Triglyceriden über den Ductus thoracicus in das venöse Blut.

Zusammenfassung

1. Ungesättigte Fettsäuren (Linol- und Linolensäure) haben an der Cholinmangelkost-Ratte eine überzeugende lipotrope Wirkung. Diese beruht wahrscheinlich auf der Rolle dieser Fettsäuren in der Phosphatidsynthese.

2. Ein Mischglycerid mit Caprin-, Capryl- und Laurinsäure als Fettsäuren führt ebenso wie Margarine im Cholinmangel zur Leberverfettung.

Literatur

[1] Ahrens, E. H.: Amer. J. Med. **23**, 928 (1957). — Lancet **6976**, 943 (1957).
[2] Alfin-Slater, R. B., L. A. Aftergood, A. F. Wells and H. J. Deuel: Arch. Biochem. **52**, 180 (1954).
[3] Allen, F. N., D. J. Bowie, J. J. R. MacLeod and W. L. Robinson: Brit. J. exp. Path. **5**, 75 (1924).
[4] Bernhard, K., and R. Schoenheimer: J. biol. Chem. **133**, 761, 713 (1940).
[5] Beveridge, J. M. R., W. F. Connell, G. A. Meyer, J. B. Firstebrook and M. S. de Wolfe: J. Nutr. **56**, 311 (1955).
[6] Bloom, B., J. C. Chaikoff and W. B. Reinhardt: Amer. J. Physiol. **166**, 451 (1951).
[7] Bronte-Stewart, B., A. Antonis, L. Eales and J. F. Brock: Lancet **1**, 521 (1956).
[8] Clement, H.: Arch. Sci. physiol. **8**, 233 (1955).
[9] Eggstein, M., u. M. Dörner: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **62**, 503 (1957).
[10] Eggstein, M., and G. Schettler: Fourth Int. Conf. Bioch. Probl. Lip. Oxford 1957.
[11] Engel, R. W.: J. Nutr. **24**, 175 (1942).
[12] Holman, R. T., H. Hayes, H. Malmros and G. Wigand: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **96**, 705 (1957).
[13] Holman, R. T.: Bioch. Probl. Lipids London 1955, S. 463.
[14] Kennedy, E. P.: Biosynthesis of triglycerides and Phospholipids Feder. Proceedings **16**, 847 (1957).

[15] Kennedy, E. P., and A. L. Lehninger: J. biol. Chem. **185**, 275 (1950).
[16] Kinsell, L. W., and G. D. Michaelis: Amer. J. clin. Nutr. **3**, 247 (1955).
[17] Klein, P. D., and R. M. Johnson: J. biol. Chem. **211**, 103 (1954).
[18] Mead, J., F. G. Steinberg and D. R. Howton: J. biol. Chem. **205**, 683 (1953).
[19] Peifer, J. J., and R. T. Holman: Arch. biol. Biophys. **57**, 520 (1956).
[20] Schulze, G., u. H. Südhof: Pflüg. Arch. ges. Physiol **258**, 211 (1953).
[21] Shapiro, W., H. Estes and H. L. Hildermann: Amer. J. Med. **23**, 898 (1957).
[22] Stevens, B. P., and J. L. Chaikoff: J. biol. Chem. **193**, 473 (1951).
[23] Thierfelder, H., u. E. Klenk: Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide. Berlin 1930.
[24] Tulpule, P. G., and J. N. Williams: J. biol. Chem. **217**, 229 (1955).
[25] Weitzel, G., H. Schön, F. Gey u. H. Kalbe: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **301**, 118 (1955).
[26] Weitzel, G., H. Schön, F. Gey u. U. Koester: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **303**, 184 (1956).
[27] Widmer, C., and R. T. Holman: Arch. Biochem. **25**, 1 (1950).

Professor Dr. med. F. Hartmann, Medizinische Universitäts-Poliklinik, Marburg/Lahn

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 185—193 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Wirkung elektrischer Reizungen im Zwischenhirn auf den Salz- und Wasserhaushalt

Von

H. Herken, J. Natzschka und G. Senft

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. April 1958)

Bei der Diskussion über die Aufgaben des Vasopressins im menschlichen und tierischen Organismus ist immer wieder betont worden, daß die Abgabe des Hormones aus dem Hypophysenhinterlappen durch die Elektrolytkonzentration der Körperflüssigkeit bestimmt wird. Nach den bekannten Untersuchungen von Verney (1926, 1929, 1946, 1947, 1948) führt eine Steigerung des osmotischen Druckes im Blutplasma, die z. B. durch Injektion hypertonischer Salzlösungen in die Art. carotis erreicht wird, zu einer Ausschüttung von Vasopressin, das unter den Bedingungen der Wasserdiurese die Harnausscheidung der Versuchstiere einschränkt, ohne die absolute Chlorausscheidung zu beeinflussen (Verney 1957).

Verney selbst hat seine Befunde nicht zur Deutung der Pathogenese von Ödemkrankheiten verwertet. Jedoch wurde von anderen Untersuchern (Peters 1952; Bartter 1957) aus seinen Experimenten gefolgert, daß die wasserretinierenden Wirkungen des Vasopressins auch unter Verhältnissen eintreten müßten, bei denen durch vorangehende Kochsalzretention im Organismus eine Erhöhung des osmotischen Druckes im Blutplasma stattgefunden hat. Die Wasserretention durch Vasopressin soll dem Zweck dienen, die Isotonie der Körperflüssigkeit wiederherzustellen. Merkwürdigerweise wurde jedoch nie diskutiert, daß dieses Hormon auch auf Grund seiner kochsalzeliminierenden Eigenschaft an der Ausscheidung eines konzentrierten Harnes mitwirken kann, die zur Wiederherstellung der normalen Osmolarität beiträgt, wobei der Umweg über die sekundäre Wasserretention vermieden wird.

Bei der kritischen Durchsicht der vorliegenden Literatur fällt auf, daß die Standardisierung von Pitressin unter Bedingungen vorgenommen wird, die sicher nicht zur Ausschüttung des endogenen Hormones führen. Auf keinen Fall entsprechen sie den Verhältnissen, die bei der Ödementstehung gegeben sind. Die Testmethoden beruhen nämlich mit wenigen Ausnahmen auf dem Prinzip, daß Vasopressin die Diurese von Versuchstieren nur dann dosisabhängig einschränkt, wenn sie vorher

durch Infusion von *Wasser* oder *hypotonischen Kochsalzlösungen* „gewässert" wurden. Die Zufuhr von destilliertem Wasser oder hypotonischen Kochsalzlösungen führt nach ihrer Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt zu einer wenigstens vorübergehenden Veränderung der Elektrolytkonzentration der Körperflüssigkeit und damit zu einer Senkung des wirksamen osmotischen Druckes, die nach Ansicht von Marx (1935), Wirz (1956) und Verney (1948, 1957) eine Hemmung der Ausscheidung von Vasopressin aus dem Hypophysenhinterlappen bewirkt.

Außerdem ist bisher wenig beachtet worden, daß die Zufuhr von isotonischen und hypertonischen Kochsalzlösungen, die bei der Ratte keine osmotische Diurese hervorruft, zu einer Verminderung oder sogar einem Ausfall der antidiuretischen Wirkung von Vasopressin führt. Die fördernde Wirkung des Hormones auf die Natriumausscheidung dagegen wird unter solchen Umständen besonders deutlich. So wurde sowohl von Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956) als auch von uns (Herken, Senft u. Schaper 1957) gefunden, daß Vasopressin bei Zufuhr von hypertonischer Kochsalzlösung keinesfalls antidiuretisch wirkt, sondern die Natrium- und Wasserausscheidung einwandfrei fördert. Bei Versuchen an Ratten mit experimentellen Ödemen zeigte sich, daß die Injektion von 100 mE Vasopressin im Stadium der primären Natriumretention eine Mehrausscheidung von Natrium und in geringerem Umfang auch von Wasser bewirkt. Beim voll ausgebildeten Ödem allerdings läßt sich dieser Effekt nicht mehr auslösen (Herken, Senft u. Schaper 1957; Davis, Howell u. Hyatt 1954).

Bei der Beurteilung dieser Befunde haben wir uns auch die Frage vorgelegt, ob die verwendeten Vasopressinmengen nicht unphysiologisch hoch sind. Die Untersuchungen von Sawyer (1952) haben nämlich gezeigt, daß kleine Vasopressindosen in der Größenordnung von 0,1 bis 1 mE nach Infusion von hypotonischen Kochsalzlösungen zwar eine Hemmung der Wasserausscheidung bewirken, jedoch keinen nennenswerten Einfluß auf den Natriumstoffwechsel der Ratte ausüben. Nach einem Hinweis von Verney (1957) liegen ähnliche Verhältnisse auch beim Hund vor. Um die Frage zu klären, ob die Ratte über Vasopressinmengen verfügt, die auch den Elektrolythaushalt des Tieres beeinflussen, haben wir versucht, durch elektrische Reizung bestimmter Gebiete des Zwischenhirnes endogenes Pitressin zur Ausschüttung zu bringen. Derartige Experimente, die an größeren Tieren, wie Ziegen, Katzen und Hunden durchgeführt wurden, sind in den letzten Jahren von mehreren Autoren beschrieben worden (Haterius 1939; Harris 1947; Koella 1949; Andersson und McCann 1955). Die gewählten Versuchsbedingungen gestatteten jedoch nur eine Beurteilung der antidiuretischen Wirkungen des endogenen Vasopressins, wobei die Veränderungen des Natriumstoffwechsels nur selten gemessen bzw. beachtet wurden, die

gerade für unsere Fragestellung von entscheidender Bedeutung waren. Bei der Durchführung unserer Versuche haben wir die zahlreichen Arbeiten berücksichtigt, die sich mit der Lokalisation der Bildungsstätten des Vasopressins im Zwischenhirn befassen (Scharrer u. Scharrer 1945, 1954; Bargmann 1949, 1950; Hild u. Zetler 1951, 1952, 1953). Hier sind vor allem die Untersuchungen von Bargmann, Hild u. Zetler zu nennen, die mit Hilfe der Chromalaun-Hämatoxylin-Phloxin-Färbung eine eingehende histologische Darstellung der Sekretionsstätten und des Transportes von Pitressin gaben, die als gut fundierte Grundlage einer Theorie über die hypothalamische Neurosekretion der Hypophysenhinterlappenhormone dienten.

Methodik

Unsere Experimente wurden an männlichen Albinoratten mit einem Gewicht von 200—250 g vorgenommen. An Stelle eines stereotaktischen Gerätes verwendeten wir einen Elektrodenhalter[1], der eine vertikale Verschiebung der Elektroden im Gehirn der Ratte ermöglicht. Seine Konstruktion ist auf der Abb. 1 wiedergegeben. Er besitzt einen Plexiglassockel, der ein Gewinde mit 0,5 mm Steigung aufweist. In das Gewinde greift eine Kappe ein, durch die ein Plexiglasstab geführt wird, an dem 2 Stahlelektroden von 0,15 mm Stärke und die Steckerbuchsen befestigt sind. Eine Umdrehung der Kappe um 360° bewirkt eine vertikale Bewegung der Elektroden um 0,5 mm. Diese Anordnung gestattet, die Tiefe der Elektroden auch nach ihrer Einsetzung in das Gehirn beliebig zu ändern. Der Ansatz des Elektrodenhalters wird von einer dünnen Polyäthylenmembran abgeschlossen, die von den Elektroden durchbrochen wird. Die Membran dient der Führung der Elektroden und bildet gleichzeitig einen festen Abschluß zwischen dem freigelegten Gehirn und der Außenwelt. Die Elektroden, deren Abstand voneinander 1,2 mm beträgt, sind mit einem Speziallack bis auf die angeschliffenen Elektrodenspitzen isoliert. Die Einführung der Elektroden ins Gehirn nahmen wir in Äthernarkose vor. Das Schädeldach der Tiere wurde mit einem Skalpell freigelegt und das Periost mit einem scharfen Löffel zur Seite geschoben. An der Kreuzung zwischen Sutura sagittalis und coronaria wurde mit einem Spezialtrepanbohrer eine Knochenplatte mit einem Durchmesser von 6 mm ausgefräst. Zur Vermeidung von Verletzungen des Sinus sagittalis und seiner Äste bei der Bohrung hatten wir den Bohrer mit einem Anschlag

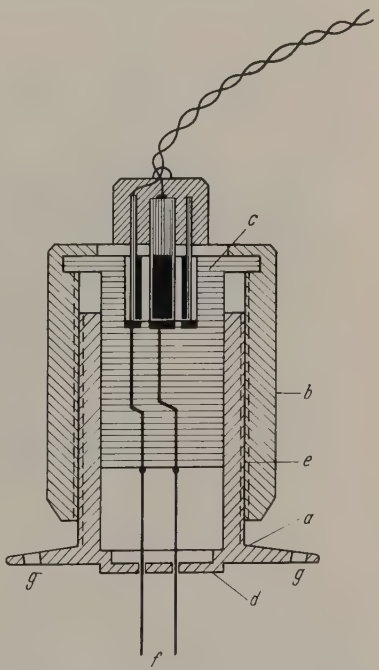


Abb. 1. Elektrodenhalter. *a* Sockel, *b* Kappe, *c* Plexiglasstab, *d* Ansatz, *e* Gewinde, *f* Elektroden, *g* Löcher für Silberschrauben

[1] Für die Konstruktion des Elektrodenhalters danken wir dem Mechanikermeister unseres Institutes, Herrn Helmut Dietz.

versehen, der ein Eindringen der Fräse über die Dura mater hinaus verhinderte. In das Bohrloch wurde der Ansatz des Elektrodenhalters eingepaßt. Der dreieckige Sockelfuß war der Wölbung des Rattenschädels weitgehend nachgebildet. Er ließ sich mit 3 Silberschrauben in der Schädelkalotte festlegen.

Nach orientierenden Vorversuchen erzielten wir reproduzierbare Reizergebnisse, wenn die Elektroden durch 10malige Umdrehung der Kappe 5 mm tief in das Rattengehirn eingeführt wurden (Röntgenaufnahme Abb. 2). Unmittelbar nach der Operation erhielt jedes Tier 125 mg Terramycin durch eine Magensonde. Die meisten Versuchstiere zeigten nach dem Eingriff keine Besonderheiten in ihrem Verhalten. Nur bei einzelnen Ratten kam es am Operationstag zu einem flüchtigen Krampfanfall unmittelbar nach dem Erwachen aus der Narkose. Frühestens 4 Tage nach dem Eingriff wurden die Tiere zu Diureseversuchen verwendet. Etwa 21 Tage darauf wurden sie getötet und ihre Gehirne zur histologischen Untersuchung in Formalin eingelegt.

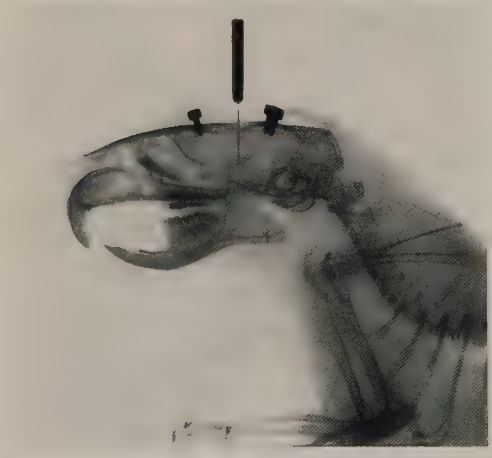


Abb. 2. Röntgenaufnahme des Rattenschädels mit eingeführten Elektroden

Die Diureseversuche führten wir in der gleichen Anordnung durch, die in der früheren Arbeit (Herken, Senft u. Wiltzky 1956) beschrieben wurde. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 6,3 ml/Std. Bei dieser Größenordnung können durch die Reizung ausgelöste antidiuretische Effekte gut erfaßt werden. Als Infusionsflüssigkeit verwendeten wir destilliertes Wasser und physiologische Kochsalzlösung. Die elektrische Erregung im Hypothalamusgebiet erfolgte mit einem Stimulator der Firma „Medeor". Der verwendete faradische Strom hatte keine Anstiegsverzögerung und besaß eine Frequenz von 8 Hz, eine Stärke von 0,8 mA sowie eine Impulsdauer von 12 msec. Ein Reizunterbrecher bewirkte, daß einer jeweiligen Reizdauer von 1 sec eine Pause von 4 sec folgte.

3 Std nach Beginn der Infusion wurde der Urin der Tiere 4 Std lang in stündlichem Abstand gesammelt. In der 2. und 4. Std der Sammelperiode wurde die Reizung vorgenommen.

Die Bestimmung der Natriumionen erfolgte mit dem Beckman-Spektrophotometer Modell DU, das mit einem Zusatzgerät zur Flammenphotometrie sowie einem Sekundär-Elektronenvervielfältiger ausgestattet war.

Versuchsergebnisse

Bei den Experimenten mit isotonischer Salzlösung wurde die absolute Natriumausscheidung durch die Reizung einwandfrei gesteigert. Nach Abschalten des Stromes erniedrigte sie sich, erreichte allerdings nicht den Ausgangswert. Eine 2. Stimulation führte wiederum zu einer gleich großen Verstärkung der Natriumausscheidung. In den Reizperioden erhöhte sich die Natriumkonzentration im Urin von 124 auf 214 bzw. von 116 auf

223 μval/ml und überstieg damit die Natriumkonzentration der Infusionsflüssigkeit um 60 bzw. 69 μval/ml. Die erreichten Unterschiede sind statistisch gesichert. Signifikante Veränderungen der Flüssigkeitsausscheidung traten unter diesen Bedingungen nicht auf (Abb. 3).

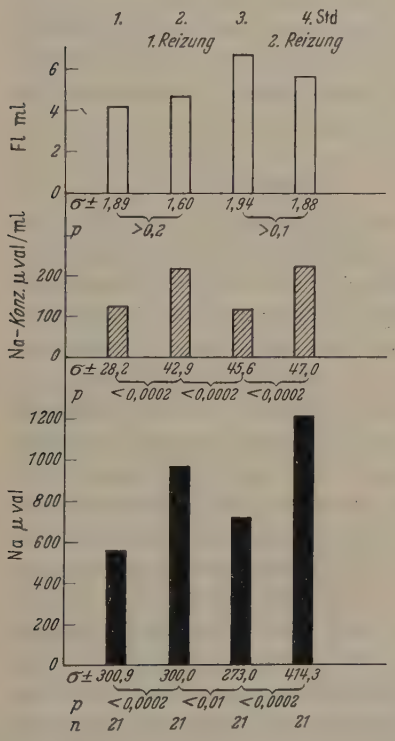


Abb. 3. Wirkung einer elektrischen Reizung im Zwischenhirn von Ratten auf die Flüssigkeits- und Natriumausscheidung. (Infusionsflüssigkeit: 6,3 ml/Std physiologische Kochsalzlösung)

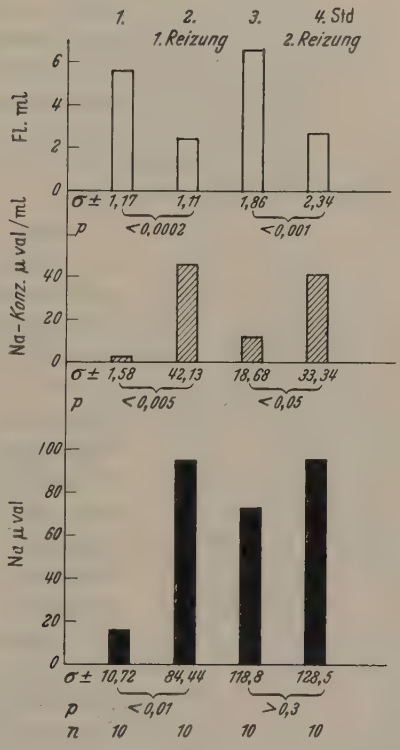


Abb. 4. Wirkung einer elektrischen Reizung im Zwischenhirn von Ratten auf die Flüssigkeits- und Natriumausscheidung. (Infusionsflüssigkeit: 6,3 ml/Std destilliertes Wasser)

Bei den Versuchen mit destilliertem Wasser wurde die Flüssigkeitsausscheidung durch die erste Stimulation signifikant erniedrigt. Nach Beendigung der Reizung wurde die Flüssigkeitsretention völlig aufgehoben. Eine 2. Stimulation führte erneut zu einer Einschränkung der Diurese. Während beider Erregungsprozesse ging die Wasserretention stets mit einer Erhöhung der Natriumkonzentration im Urin einher. Die absolute Natriumausscheidung wurde häufig, jedoch nicht regelmäßig erhöht. Auffälligerweise hielt der Natrium-diuretische Effekt nach der ersten Reizung durchschnittlich länger als die Einschränkung der Flüssigkeitsausscheidung an (Abb. 4).

Tabelle. *Ausscheidung von Flüssigkeit und Natrium im Urin bei den Kontrolltieren*

		1. Std			2. Std			3. Std			4. Std		
		Fl ml	Na µval/ml	Na µval	Fl ml	Na µval/ml	Na µval	Fl ml	Na µval/ml	Na µval	Fl ml	Na µval/ml	Na µval
Infusion von 6,3 ml/Std	m	4,7	133,5	677,4	5,3	150,3	828,7	4,6	147,8	713,7	4,9	150,6	721,1
0,9%iger NaCl Lösung n = 15 . .	σ±	2,47	62,53	395,0	1,54	32,1	308,0	2,13	21,0	370,0	1,7	17,4	278,6
Infusion von 6,3 ml/Std	m	5,5	2,74	15,3	5,3	2,94	16,8	5,0	3,23	15,5	5,9	2,91	16,5
dest. Wasser n = 10	σ±	2,95	2,66	15,0	1,14	2,88	16,15	1,93	2,44	12,2	0,84	2,14	12,32

Die beschriebenen Veränderungen im Natrium- und Wasserstoffwechsel gleichen einer Vasopressinwirkung. Sie waren bei den Kontrolltieren der entsprechenden Versuchsgruppen nicht zu beobachten (Tabelle). Aus den Versuchen läßt sich ableiten, daß die Effekte der Reizung ungefähr einer einstündigen Wirkung von 30—40 mE Vasopressin je Tier entsprechen, wenn Experimente mit exogenem Vasopressin zum Vergleich herangezogen werden.

Diskussion

Obwohl die geringen Dimensionen des Rattengehirns die Einführung der Elektroden an eine definierte Stelle des Zwischenhirnes sehr erschwerten, gelang es, die beschriebenen Veränderungen im Natrium- und Wasserstoffwechsel bei 22 von 38 Versuchstieren zu reproduzieren. Abgesehen von der möglichen Verfehlung des Reizortes haben histologische Untersuchungen ergeben, daß negativ verlaufende Experimente auf Verletzungen zurückgeführt werden können, die bei Einführung der Elektroden im Zwischenhirn entstehen und auch bei vorsichtiger Handhabung nicht immer zu vermeiden waren. Die histologischen Untersuchungen der Gehirne sämtlicher Versuchstiere sind noch nicht abgeschlossen. Nach den bisherigen Feststellungen liegen die Elektroden im vorderen Zwischenhirn oberhalb der nuclei supraoptici sowie rostral der nuclei paraventriculares und damit nahe dem von Jewell u. Verney (1957) vermuteten Sitz der Osmoreceptoren.

Die Beobachtung, daß die elektrische Erregung die Flüssigkeitsausscheidung unter den Bedingungen der Wasserdiurese einschränkt, die Natriumausscheidung dagegen bei Infusion von isotonischer Salzlösung ohne gleichzeitige Wasserretention stark fördert, läßt den Schluß zu, daß die Stimulation mit großer Wahrscheinlichkeit Vasopressin zur Ausschüttung bringt. Eine gleichzeitige Freisetzung

von geringen Oxytocinmengen durch die Reizung läßt sich nicht mit Sicherheit ausschließen. Jedoch ist es nicht möglich, die beschriebenen Veränderungen auf die Wirkung allein dieses Hormones zurückzuführen. Die Injektion von Oxytocin beeinflußt nämlich bei der Ratte die Diurese während der Infusion von destilliertem Wasser nicht und führt bei Zufuhr von isotonischer Kochsalzlösung zu einer Vermehrung der Wasser- und Salzausscheidung ohne wesentliche Erhöhung der Natriumkonzentration im Urin (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956). In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß nach den Untersuchungen von van Dyke et al. (1955), Hild u. Zetler (1952) und M. Vogt (1953) im Hypothalamus überwiegend Vasopressin gegenüber geringen Oxytocinmengen gefunden wird, während der Gehalt des Hypophysenhinterlappens an beiden Hormonen ungefähr gleich groß ist.

Bei der Deutung der Versuchsergebnisse ist auch die Frage zu diskutieren, ob die beobachtete Mehrausscheidung ausschließlich unter der Beteiligung von Vasopressin zustandekommt. Földi, Kovách et al. (1957, 1958) konnten nämlich in Experimenten an Hunden mit gekreuzter Zirkulation feststellen, daß die Injektion einer hypertonischen Kochsalzlösung in die Carotis des Acceptorhundes, dessen Kopf lediglich über das Nervensystem mit dem Rumpf verbunden war, zu einer stark erhöhten Natriumausscheidung im Urin führte. Durch diese Untersuchungen wird nicht völlig ausgeschlossen, daß dem Vasopressin innerhalb des Zentralnervensystems eine Aufgabe als Überträgerstoff zukommt, der an der Mehrausscheidung von Natrium im Urin mitwirkt (Kovách 1958).

Wenn die in unseren Versuchen gefundene Mehrausscheidung von Natrium nach Stimulation im Zwischenhirn allein auf dem Wege über das Nervensystem veranlaßt wird, so ist allerdings der bei Infusion von destilliertem Wasser beobachtete antidiuretische Effekt der Reizung schwer zu erklären.

Selbst wenn man einräumt, daß eine elektrische Erregung des Zwischenhirnes mehr als einen physiologischen Reiz zur Ausschüttung von Vasopressin darstellt, sprechen die Intensität des Effektes und die Möglichkeit seiner Reproduktion in zeitlich kurzem Abstand dafür, daß die Ratte Vasopressinmengen zur Verfügung hat, die den Natriumstoffwechsel beeinflussen können. Dieses Resultat stützt die Angaben von Sawyer (1952), der auf Grund von Berechnungen zu dem gleichen Ergebnis gekommen ist, und entkräftet weitgehend den Einwand, daß die Natrium-diuretischen Wirkungen des Hormones nur bei Verwendung unphysiologisch hoher Dosen zu beobachten seien. Auch Verney (1957) hat in erst kürzlich veröffentlichten Untersuchungen gefunden, daß Vasopressin neben dem antidiuretischen Effekt die Chlorausscheidung im Urin absolut erhöht, wenn das durch eine orale Wassergabe bedingte

Absinken der Osmolarität durch eine i.v. Infusion entsprechender Kochsalzmengen ausgeglichen wird. Unsere Befunde können als weitere Bestätigung der schon früher geäußerten Ansicht gelten, daß Vasopressin auch eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des Natriumstoffwechsels hat.

Summary

Former experiments have demonstrated that the antidiuretic effect of Vasopressin in rats is decreased when the concentration of sodium chloride of the infusate is increased. During infusion of isotonic sodium chloride solution Vasopressin enhances the output of sodium in urine without significant antidiuresis.

Experiments have been performed in order to try the release of Vasopressin by electrical stimulation within the diencephalon. We wanted to know whether the amounts of Vasopressin synthesized in rats are sufficient to effect sodium metabolism.

To install the electrodes in the diencephalon of male albino rats, a special stereotactic instrument has been used the construction of which is described. During electrical stimulation an increase of urinary sodium concentration and sodium output without antidiuresis has been observed when isotonic saline solution was infused. During infusion of destilled water electrical stimulation resulted in antidiuresis and in a small increase of urinary sodium output.

The results allow the conclusion that electrical stimulation of the diencephalon releases amounts of Vasopressin sufficient to effect the metabolism of water and that of sodium in rats.

Für die Unterstützung der Arbeit danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

Andersson, B., and S. M. McCann: Acta physiol. scand. **33**, 333 (1955).

Bargmann, W.: Klin. Wschr. **1949**, 617. — Mikroskopie **5**, 289 (1950).

Bartter, F. C.: The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation **10**, Suppl. 31. — International Congress on Clinical Chemistry Stockholm, August 19.—23. 1957, S. 50.

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 434, 457 (1956).

Davis, J. O., D. S. Howell u. R. E. Hyatt: Endocrinology **55**, 409 (1954).

van Dyke, H. B., K. Adamsons jr. and L. E. Stanford: Recent Progr. Hormone Res. XI, 1 (1955).

Földi, M., A. Kovách, P. Roheim, N. Papp u. E. Koltay: Z. ges. exp. Med. **129**, 15 (1957).

Földi, M., u. A. Kovách: Symposion über nervale Regulationen der Nierenfunktion, Berlin 28.—30. 3. 1958 (im Druck).

Harris, G. W.: Phil. Trans. B. **232**, 385 (1947). — J. Physiol. (Lond.) **107**, 418 (1948).

Haterius, H. O.: Amer. J. Physiol. **128**, 506 (1939/40).

Herken, H., G. Senft u. J. Schaper: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **230**, 284 (1957).

Herken, H., G. Senft u. H. Wilutzky: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 123 (1956)

Hild, W., u. G. Zetler: Experientia (Basel) **7**, 189 (1951). — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **213**, 139 (1951). — Klin. Wschr. **1952**, 433. — Dtsch. Z. Nervenheilk. **167**, 205 (1952). — Pflügers Arch. ges. Physiol. **257**, 169 (1953).

Jewell, P. A., and E. B. Verney: Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences. Vol. **240**, 197 (1957).

Koella, W.: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 785, 819.

Kovách, A.: Persönliche Mitteilung (1958).

Marx, H.: Der Wasserhaushalt des gesunden und kranken Menschen. Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen und der Tiere. 33. Band, Berlin: Springer 1935.

Peters, J. P.: Amer. J. Med. **1952**, 66.

Sawyer, W. H.: Amer. J. Physiol. **169**, 583 (1952).

Scharrer, E., and B. Scharrer: Physiol. Rev. **25**, 171 (1945).

Verney, E. B.: Proc. roy. Soc. B. **99**, 487 (1926). — Lancet **216**, I, 539 (1929); **251**, II, 739, 781 (1946). — Proc. roy. Soc. B. **135**, 25 (1947). — Brit. med. J. **1948**, II. 119. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **205**, 387 (1948). — Lancet, II. 1237, 1295 (1957).

Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **8**, 193 (1953).

Wirz, H.: Pathologische Physiologie und Klinik der Nierensekretion. III. Freiburger Symposion, 27.—29. Juni 1954. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer (1955), S. 1.

Prof. Dr. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 194—205 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Hemmung der Serotoninbildung durch α-Methyl-Dopa

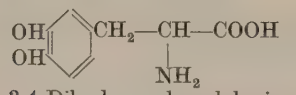
Von

E. Westermann, H. Balzer und J. Knell

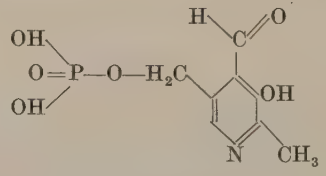
Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. März 1958)

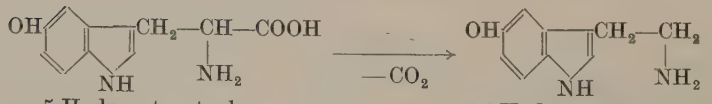
Serotonin (5-Hydroxytryptamin) entsteht wie andere körpereigene Amine, z. B. *Histamin*, *Tyramin*, *Hydroxytyramin* (Dopamin) durch Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäure. Das Coenzym aller bisher untersuchten Aminosäuredecarboxylasen ist der dem Vitamin B_6 — Pyridoxin — entsprechende phosphorylierte Aldehyd, *Pyridoxal-5-phosphat*. Blockierung des Coenzyms hemmt deshalb die Wirkung aller Aminosäurendecarboxylasen. Blockierung des Apoenzyms, das für die Substratspezifität der Wirkung verantwortlich ist, müßte eine elektive Hemmung bestimmter Decarboxylasen ermöglichen.



3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) — Hydroxytyramin (Dopamin)



Pyridoxal-5-phosphat



5-Hydroxytryptophan — 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

Die wirksamste organeigene Aminosäurendecarboxylase ist die *Dopadecarboxylase* (Holtz u. Mitarb. 1938). Sie kommt nicht nur in den für den Aminosäurenstoffwechsel wichtigen Organen — Leber und Niere — vor, sondern auch an den Stellen im Organismus, an denen das Produkt der Fermentwirkung — Hydroxytyramin (Dopamin) — als

Muttersubstanz für die Noradrenalin- und Adrenalinbildung benötigt wird: im Nebennierenmark (Langemann 1951; Holtz u. Bachmann; Westermann 1957) und in den sympathischen Nerven (Holtz u. Westermann 1955). Diese enthalten neben Noradrenalin, dem Überträger der Nervenwirkung, auch Dopamin (Schümann 1956).

5-Hydroxytryptophan wird ebenfalls durch Nierenextrakte decarboxyliert (Udenfriend, Clark u. Titus 1953). Hierbei entsteht 5-Hydroxytryptamin (Serotonin).

Bei Reinigungs- und Anreicherungsversuchen änderte sich die Relation Dopa-Decarboxylaseaktivität:5-Hydroxytryptophan-Decarboxylaseaktivität (Clark, Weissbach u. Udenfriend 1954). Die Autoren nehmen an, daß beide Aminosäuren durch zwei verschiedene Fermente abgebaut werden. 5-Hydroxytryptophan wird aber auch durch Extrakte, z. B. aus sympathischen Ganglien, decarboxyliert, die kein Serotonin enthalten (Gaddum u. Giarman 1956).

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, daß überall da, wo Dopadecarboxylase sich nachweisen läßt, auch 5-Hydroxytryptophan decarboxyliert wird, und daß *α-Methyl-Dopa*, das in vitro als „langsam reversibler Hemmstoff mit Angriffspunkt am Apoenzym" ein kompetitiver Inhibitor der Dopadecarboxylase ist (Sourkes 1954), sowohl in vitro als in vivo auch die Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan hemmt. Eine damit mögliche Hemmung der Serotoninbildung wäre therapeutisch erwünscht, wenn beim metastasierenden *Darmcarcinoid* eine pathologisch erhöhte Produktion des Amins die Ursache klinischer Symptome wird, die auf Grund der pharmakologischen Wirkungen des Serotonins in Durchfällen (darmerregende Wirkung), Hyperämie und Cyanose (venoconstrictorische und durch Freisetzung von Histamin capillarerweiternde Wirkung), sowie „asthmatischen" Anfällen (bronchoconstrictorische Wirkung) bestehen.

Methodik

Herstellung der Enzympräparate. Die frischen Organe wurden mit der Schere zerkleinert und mit der 3—5fachen Gewichtsmenge 0,067 m Na-Phosphatpuffer (p_H 6,5—8,1) 2—3 min lang im Homogenisator mit 13000 U/min unter Eiskühlung homogenisiert (Homogenat). In den meisten Versuchen wurde das Homogenat mit 3000 x g zentrifugiert und der Überstand über Watte filtriert (Extrakt).

Adsorptionsversuche. Organhomogenate bzw. -extrakte wurden 1—6mal mit *Kaolin* (gereinigt, eisenfrei, Fa. Riedel de Haën) bzw. *Bolus alba* (pulv. subt. DAB 6) — 1 g/10 ml — unter Eiskühlung 2 min lang geschüttelt und anschließend 5 min lang mit 2000 x g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit bzw. das durch Lyophilisieren gewonnene Pulver (Holtz u. Westermann 1957), diente als Enzympräparat.

Decarboxylase-Aktivität. Warburg-Apparatur. Manometrische Bestimmung des abgespaltenen $CO_2 \cdot N_2$-Atmosphäre; 37° C. Die Versuchsansätze enthielten 1,0 bis 2,5 ml Organextrakt + 0,2 ml Aqua dest. bzw. 20 μg Pyridoxal-5-phosphat in

0,2 ml Aqua dest. + 0,3—0,4 ml einer 0,025 m Lösung von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) bzw. L-5-Hydroxytryptophan in Aqua dest. — Zu Ende der Versuche bei p_H 8,1 (bzw. p_H 7,4) wurden 0,2 ml 10% ige H_2SO_4 in den Hauptraum eingekippt, um das gebundene CO_2 freizusetzen.

Aminoxydase-Aktivität. Warburg-Apparatur. Manometrische Messung des O_2-Verbrauchs. O_2-Atmosphäre; 37° C. Die Versuchsansätze enthielten 2,5 ml Homogenat bzw. Extrakt + 0,2 ml einer 0,15 m Lösung von Tyraminhydrochlorid *(Monoaminoxydase)* bzw. Putrescindihydrochlorid *(Diaminoxydase)* in Aqua dest. + 0,2 ml 15% ige KOH im mittleren Einsatz.

Bronchokonstriktion. Meerschweinchen in Urethannarkose (1,2—1,5 g/kg s.c.) Messung des Lungenvolumens nach der Methode von Konzett u. Rössler. Blutdruckregistrierung in A. carotis. Intravenöse Injektionen in V. jugularis.

Narkose. Gruppen von je 5 gleichschweren männlichen weißen Mäusen, die bei konstanter Raumtemperatur (26° C) in 3 l-Gläsern gehalten wurden, erhielten 75 mg/kg *Evipan-Na* (Cyclohexenylmethyl-N-methylbarbitursaures Natrium) intraperitoneal; die jeweils gleiche Anzahl von Tieren vorher (die Zeiten sind in der Tabelle angegeben) 100 mg/kg *Iproniazid* (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid) und 100 mg/kg α-*Methyl-Dopa* (DL-α-Methyldihydroxyphenylalanin) intramuskulär 20 mg/kg 5-Hydroxytryptophan intravenös. — Die Wirkung des Narkoticums galt als abgeklungen, wenn die Tiere keine passive Seitenlage mehr ertrugen. Die Änderungen der Narkosedauer wurden mit Hilfe des *t*-Testes (*P*-Wert) statistisch gesichert. (Einzelheiten der Methodik siehe Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler; Holtz, Balzer u. Westermann.)

Biologische Bestimmung von 5-Hydroxytryptamin. Rattenuterus bzw. *Meerschweinchenileum* in 5,0 ml Tyrode. Atropin. sulf. 10^{-6}. Austestung gegen Serotonin (5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat).

Ergebnisse

1. Decarboxylierung von Dopa und 5-Hydroxytryptophan durch Organextrakte

Die in der Tab. 1 dargestellten Versuchsbeispiele zeigen, daß Organextrakte mit hoher Dopadecarboxylaseaktivität, z. B. Meerschweinchenniere und -leber, Kaninchenniere, auch 5-Hydroxytryptophan decarboxylieren. Der *Quotient* Dopa-Decarboxylaseaktivität: 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylaseaktivität liegt bei 2. Die Enzymaktivität von Darm- und Magenextrakten (Meerschweinchen) ist beiden Aminosäuren gegenüber schwächer, Dopa und 5-Hydroxytryptophan werden aber etwa gleichstark decarboxyliert, so daß der Quotient 1 beträgt. Die Ursache ist offensichtlich ein relativer Coenzymmangel. Setzt man nämlich den Versuchsansätzen 20 μg Pyridoxal-5-phosphat zu, so wird die Dopadecarboxylierung weit stärker aktiviert als die des 5-Hydroxytryptophans, so daß der Quotient jetzt sogar höher als 2 ist. Organe, die Dopa nicht oder nicht nennenswert decarboxylieren, wie Kaninchenileum, -caecum, -colon, greifen auch 5-Hydroxytryptophan nicht an.

In den Organen, die nicht nur das Enzym (Holtz u. Westermann 1956; Langemann 1951; Holtz u. Bachmann; Westermann 1957; Burger u. Langemann; Langemann 1956), sondern auch die Amine enthalten, und in denen diesen physiologische oder pathologisch-physiologische

Tabelle 1. *Decarboxylierung von Dopa und 5-Hydroxytryptophan durch Organextrakte Warburg-Apparatur.* Die Enzymaktivität ist in Kubikmillimeter CO_2/60 min ausgedrückt und für 1 g Frischgewebe berechnet. — Die Versuchsansätze enthielten 2,5 ml Organextrakt 1:3 bis 1:5 p_H 8,1 (siehe Methodik) und 0,4 ml einer 0,025 m Lösung von Dopa bzw. 5-Hydroxytryptophan (5-HT). Pyridoxal-5-phosphat: Zusatz von 20 μg in 0,2 ml Aq. dest. — Die „Leerwerte" sind in Abzug gebracht

Tierart	Organ	—			+ Pyridoxal-5-phosphat		
		Dopa	5-HT	Dopa / 5-HT	Dopa	5-HT	Dopa / 5-HT
Meerschweinchen	Niere	288	134	**2,15**	416	160	**2,60**
	Leber	186	82	**2,27**	334	152	**2,20**
	Ileum	74	78	**0,95**	274	138	**2,00**
	Magen	58	58	**1,00**	178	72	**2,48**
	Caecum	52	44	**1,18**	106	70	**1,52**
	Colon	24	30	**0,80**	114	48	**2,38**
Kaninchen	Niere	183	130	**1,41**	274	135	**2,03**
	Ileum	13	2		18	4	
	Caecum	0	0		0	0	
	Colon	0	0		0	0	

Tabelle 2. *Decarboxylaseaktivität von Extrakten aus Nebennierenmark, Phäochromocytom und Dünndarmcarcinoid*

Warburg-Apparatur. Die Enzymaktivität ist in Kubikmillimeter CO_2/60 min ausgedrückt. Organextrakte p_H 6,5 (siehe Methodik): *Rindernebennierenmark* (2,5 ml 1:3), *Phäochromocytom* (2,0ml 1:2), *Dünndarmcarcinoid* (1,5ml 1:10), *Lebermetastasen des Carcinoids* (2,5 ml 1:3). — *Substrat.* 0,4 ml einer 0,025 m Lösung von Dopa bzw. 5-Hydroxytryptophan (5-HT). Pyridoxal-5-phosphat: 20 μg in 0,2 ml. — Die „Leerwerte" sind in Abzug gebracht

Organ	—		+ Pyridoxal-5-phosphat	
	Dopa	5-HT	Dopa	5-HT
Nebennierenmark . . .	47	53	117	60
Phäochromocyten . . .	8	8	177	30
Darmcarcinoid	6	9	52	12
Lebermetastasen des Carcinoids	21	8	166	21

Bedeutung zukommt: *Dopamin* in sympathischen Nerven (Milznerven), im Nebennierenmark und Phäochromocytom, *Serotonin* im Darmcarcinoid und seinen Lebermetastasen, Dopamin *und* Serotonin im Gehirn —, herrscht anscheinend ein besonders großer Coenzymmangel. Zusatz von Pyridoxal-5-phosphat aktiviert besonders stark (Tab. 2). Bemerkenswert ist, daß Dopa auch durch Extrakte aus Darmcarcinoid und seinen Lebermetastasen, die nur Serotonin, kein Dopamin enthalten, stärker als 5-Hydroxytryptophan decarboxyliert wird, und Coenzymzusatz auch

hier die Dopadecarboxylierung stärker aktiviert als die 5-Hydroxytryptophandecarboxylierung.

Die unterschiedliche *Aktivierbarkeit* zeigt besonders deutlich ein Versuch mit Nebennierenmarkextrakt, in dem das p_H nicht 8,1 — wie in den bisherigen Versuchen — sondern nur 6,5 betrug, so daß der zeitliche Verlauf der Decarboxylierung verfolgt werden konnte (Abb. 1). Ohne Coenzymzusatz erfolgt die Decarboxylierung von Dopa schneller,

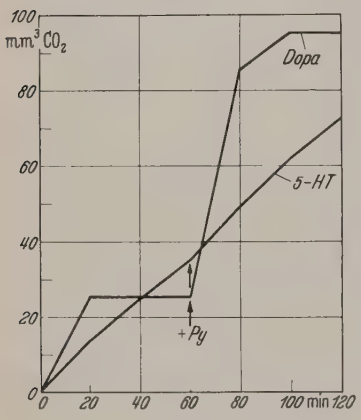


Abb. 1

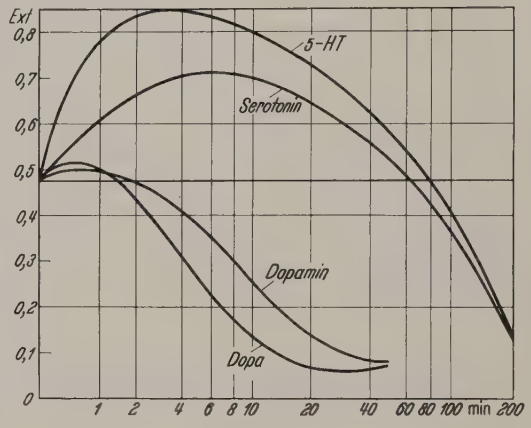


Abb. 2

Abb. 1. *5-Hydroxytryptophandecarboxylierung durch Nebennierenmarkextrakte. Warburg-Apparatur* Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2. *Versuchsansätze*: *Hauptraum*: 2,0 ml Rindernebennierenmarkextrakt 1:3 p_H 6,5. *1. Birne*: 0,3 ml einer 0,025 m Lösung von Dopa bzw. 5-Hydroxytryptophan (*5-HT*). *2. Birne*: 20 μg Pyridoxal-5-phosphat in 0,2 ml Aq. dest. (*Py*). — Nach 60 min wird der Inhalt der 2. Birne in den Hauptraum eingekippt. — Die „Leerwerte" sind in Abzug gebracht

Abb. 2. *Extinktionskurven der Inkubate von Pyridoxal-5-phosphat mit Dopa und Dopamin sowie 5-Hydroxytryptophan und Serotonin. Elektrophotometer (ELKO II)*: Zeiß-Opton-Filter $A_{42}E_{52}$. Cuvette mit 0,003 cm Schichtdicke. Raumtemperatur 22° C. Die Cuvette wird mit 5,0 ml einer 0,0003 m Lösung von Pyridoxal-5-Phosphat in 0,5 m Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 beschickt (Extinktion 0,475). Dazu werden 0,2 ml einer 0,05 m Lösung von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (*Dopa*), Hydroxytyramin (*Dopamin*), DL-5-Hydroxytryptophan (*5-HT*) bzw. 5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat (*Serotonin*) — berechnet auf Base — pipettiert. — Die Extinktion wird während der ersten 10 min in 10 sec-Intervallen, danach in 5 min-Intervallen bestimmt

kommt aber auch schneller zum Stillstand, während die Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan kontinuierlich verläuft und diejenige des Dopa mit der Zeit überflügelt. *Zusatz* von Coenzym läßt die Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan praktisch unbeeinflußt, führt jedoch zu einer starken Aktivierung der Dopadecarboxylierung.

Die Ursache ist, daß Dopa und Dopamin schnell, 5-Hydroxytryptophan und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) nur langsam eine zur Inaktivierung des Coenzyms führende Reaktion mit diesem unter Farbvertiefung und Bildung einer Schiffschen Base mit anschließendem Ringschluß der Seitenkette unter Entfärbung der Lösungen und Bildung von Tetrahydroisochinolin- bzw. Tetrahydrocarbolinderivaten eingehen

(vgl. Heyl, Luz, Harris u. Folkers 1952; Schott u. Clark 1952; Holtz u. Westermann 1957). Inkubiert man Pyridoxal-5-phosphat mit Dopa und Dopamin bzw. 5-Hydroxytryptophan und Serotonin, so nimmt im ersten Fall die photometrisch bestimmte Extinktion nach einer kurzdauernden Zunahme ab, während im zweiten Fall der Abnahme eine langdauernde Zunahme der Extinktion voraufgeht (Abb. 2). Die durch die Abnahme der Extinktion angezeigte Inaktivierung des Coenzyms — wie auch des Amins — erfolgt mit den beiden Brenzcatechinderivaten schnell, mit den Indolderivaten nur langsam.

2. Adsorptionsversuche mit Kaolin

In Nierenextrakten, die sowohl Histidin als auch Dopa decarboxylieren, ließ sich durch mehrfaches Schütteln mit *Kaolin* die *Histidin-*, nicht aber die *Dopa*decarboxalyse adsorbieren; auch die *Monoaminoxydase* der Extrakte ging an Kaolin (Holtz, Heise u. Spreyer; Holtz, Credner u. Walter). Schüttelt man Gehirnhomogenate mit Kaolin, so wird die *Glutaminsäure*decarboxylase adsorbiert, die *Dopa*decarboxylase bleibt in Lösung (Holtz u. Westermann 1957).

Tabelle 3. *Trennung der Aminosäurendecarboxylase von Mono- und Diaminoxydase durch Adsorption an Bolus alba*

Enzympräparate. Schweinenierenextrakt 1:2,5 p_H 7,4 wurde 4mal mit Bolus alba (Vers.-Nr. 1) bzw. 6mal mit Kaolin (Vers.-Nr. 2) geschüttelt und anschließend zentrifugiert (siehe Methodik). Die überstehende Flüssigkeit diente als Enzympräparat. – Warburg-Apparatur. *Decarboxylaseaktivität:* Kubikmillimeter CO_2/30min. 1,0 ml Extrakt + 0,4 ml einer 0,025 m Lösung von Dopa bzw. 5-Hydroxytryptophan (5-HT) + 20 µg Pyridoxal-5-phosphat in 0,2 ml. — *Aminoxydaseaktivität.* Kubikmillimeter O_2/60 min (siehe Methodik). 2,5 ml Extrakt + 0,2 ml einer 0,15 m Lösung von Tyraminhydrochlorid (*Monoaminoxydase*) bzw. Putrescindihydrochlorid (*Diaminoxydase*). Die „Leerwerte" sind in Abzug gebracht

Vers.-Nr.		mm³ CO_2		mm³ O_2	
		Dopa	5-HT	Tyramin	Putrescin
1	—	195	88	362	140
	(Bolus alba)	190	85	0	0
2	—	163	69	355	150
	(Kaolin)	149	63	0	113

Aus der Tab. 3 ist zu ersehen, daß ein Schweinenierenextrakt nach mehrmaligem Ausschütteln mit Bolus alba seine Decarboxylaseaktivität auch gegenüber 5-Hydroxytryptophan unvermindert beibehält, während die Mono- und Diaminoxydase (Tyramin bzw. Putrescin als Substrat) vollständig adsorbiert wird. Durch Schütteln mit dem gröber dispersen Kaolin läßt sich auch eine gewisse Trennung von Mono- und Diaminoxydase erzielen.

3. Hemmung der 5-Hydroxytryptophandecarboxylierung durch α-Methyl-Dopa

Injiziert man Meerschweinchen 100 mg/kg *α-Methyl-Dopa* i.m. und untersucht anschließend die Decarboxylaseaktivität der Niere in der Warburg-Apparatur, so findet man, daß nicht nur die Dopadecarboxylase gehemmt ist, sondern auch die Decarboxylierung des 5-Hydroxytryptophans (Tab. 4). Schon 15 min nach der Injektion ist die Enzym-

Tabelle 4. *Hemmung der Dopa- und 5-Hydroxytryptophandecarboxylierung durch α-Methyl-Dopa*

Meerschweinchen (280—320 g) erhielten 100 mg/kg α-Methyl-Dopa (DL-α-Methyl-3,4-Dihydroxyphenylalanin) i.m. — 15, 30, 60, 90 und 150 min nach der Injektion wurden Tiere getötet und die Decarboxylaseaktivität der Nierenextrakte mit Dopa und 5-Hydroxytryptophan als Substrat bestimmt. — *Warburg-Apparatur.* Manometrische Messung der in 40 min abgespaltenen CO_2. *Versuchsansätze.* 2,0 ml Meerschweinchennierenextrakt 1:5 p_H 6,5 + 0,4 ml einer 0,025 m Lösung von Dopa bzw. 5-Hydroxytryptophan. — In den Ansätzen mit 5-Hydroxytryptophan wurde das entstandene 5-Hydroxytryptamin auch biologisch bestimmt (siehe Methodik)

Zeit nach α-Methyl-Dopa i.m.	Dopa		5-Hydroxytryptophan			
	mm^3 CO_2	Proz.-Hemmung	mm^3 CO_2	Proz.-Hemmung	5-Hydroxytryptamingehalt (μg)	Proz.-Hemmung
—	150	0	60	0	615	0
15 min	37	75	0	100	26	96
30 min	41	73	1	99	43	93
60 min	59	61	3	95	62	90
90 min	76	49	10	83	90	85
150 min	117	22	34	43	410	33

aktivität um 75% gegenüber der Norm abgesunken, wenn man Dopa als Substrat nimmt. In den 5-hydroxytryptophanhaltigen Ansätzen läßt sich zu diesem Zeitpunkt manometrisch überhaupt keine CO_2-Abspaltung nachweisen. Die biologische Austestung der Inkubate ergibt, daß trotzdem eine geringe Menge 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) entstanden ist. Die Hemmung der an sich schwächeren 5-Hydroxytryptophandecarboxylierung beträgt 96%. Die geringen abgespaltenen CO_2-Mengen werden im manometrischen Versuch retiniert. 150 min nach der Injektion wird die Hemmung schwächer: sie beträgt noch 22% gegenüber Dopa, 33% gegenüber 5-Hydroxytryptophan.

4. Hemmung der Serotoninbildung in vivo

a) Schon kleine Mengen Serotonin wirken bei i.v. Injektion *bronchoconstrictorisch* (Reid u. Rand; Comroe, van Lingen, Stroud u. Roncoroni; Kottegoda u. Mott; Konzett; Balzer, Greeff u. Westermann; Westermann 1958). Es durfte deshalb erwartet werden, daß bei

Injektion der Aminosäure — 5-Hydroxytryptophan — auch in vivo durch Decarboxylierung bronchoconstrictorisch wirksame Serotoninmengen entstehen würden.

In früheren Untersuchungen hatte sich zeigen lassen, daß die i.v. Injektion von *Dopa* bei Kaninchen *hyperglykämisch* wirkt (Holtz u. Credner 1943) und bei Katzen wie Hydroxytyramin (Dopamin) blutdruck*steigernd*, bei Kaninchen und Meerschweinchen, bei denen

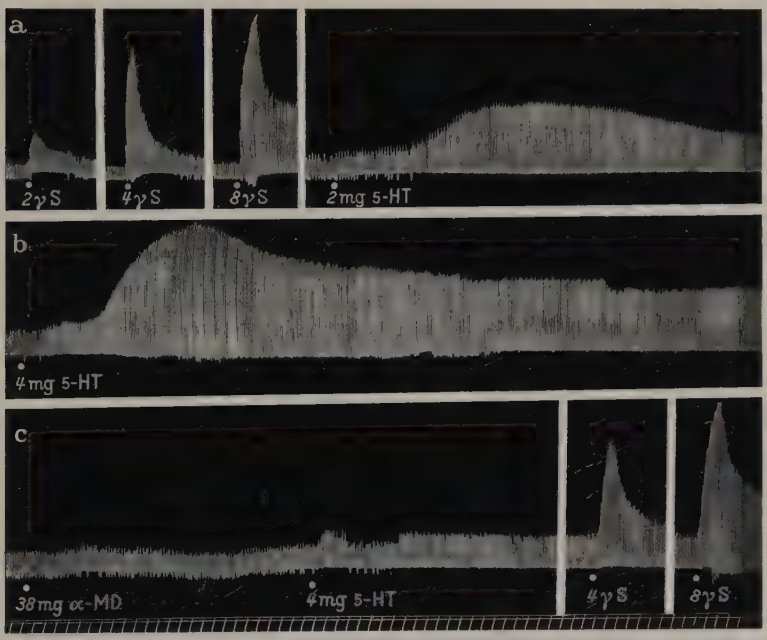


Abb. 3 a—c. *Bronchoconstrictorische Wirkung von 5-Hydroxytryptophan. Verhinderung der Wirkung durch α-Methyl-Dopa. Meerschweinchen* 380 g. Urethannarkose. Methode: Konzett u. Rössler. Injektionen in die V. jugularis. Zeitschreibung: 10 sec. *S*: Serotonin, *5-HT*: 5-Hydroxytryptophan, *α-MD*: α-Methyl-Dopa

Dopamin den Blutdruck erniedrigt, blutdruck*senkend* (Holtz u. Credner 1942). Auch die Beobachtung, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des Dopa an der Katze sich durch Blockierung der Monoaminoxydase mit Iproniazid und durch Vitamin B_6 (Pyridoxin) — die Muttersubstanz des Coenzyms der Decarboxylase (Pyridoxal-5-phosphat) — verstärken (Balzer u. Holtz 1956) und durch α-Methyl-Dopa verhindern ließ (Dengler u. Reichel 1957), sprach dafür, daß die Blutdruckwirkung nicht der Aminosäure selbst, sondern dem durch Decarboxylierung aus ihr entstandenen Amin (Dopamin) zukam.

In dem Versuch der Abb. 3 verursachen 2, 4 und 8 μg *Serotonin* am Meerschweinchen eine dosisabhängige, akute Bronchokonstriktion. Die

i.v. Injektion von 2 und 4 mg *5-Hydroxytryptophan* führt zu einer ebenfalls dosisabhängigen, allmählich einsetzenden, protrahiert verlaufenden bronchoconstrictorischen Reaktion. Die Injektion von α-Methyl-Dopa (100 mg/kg) hat keine Wirkung. 4 mg 5-Hydroxytryptophan, 5 min später injiziert, sind jetzt ohne jede bronchoconstrictorische Wirkung, während Serotonin noch wirksam ist. Der Dopa-Antimetabolit und Hemmstoff der *Dopa*decarboxylase — α-Methyl-Dopa — hat demnach auch *in vivo* die Entstehung von *Serotonin* aus 5-Hydroxytryptophan verhindert.

Tabelle 5. *Beeinflussung der zentralerregenden Wirkung des 5-Hydroxytryptophans durch α-Methyl-Dopa*

Gruppen weißer Mäuse erhielten 27 Std vor dem Versuch 100 mg/kg Iproniazid i.m. Gruppe I: 75 mg/kg Evipan-Na i.p. Gruppe II: α-Methyl-Dopa (100 mg/kg i.m.), 15 min vor Evipan. Gruppe III: 5-Hydroxytryptophan (20 mg/kg i.v.), 5 min vor Evipan. Gruppe IV: α-Methyl-Dopa, 15 min + 5-Hydroxytryptophan, 5 min vor Evipan

Vers.-Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	75,0	Evipan	34,0	—	—
	II	100,0	+ α-Methyl-Dopa	29,4	II: I = — 14	0,3
	III	20,0	+ 5-Hydroxytry.	0[1]	III: II = —100	0,001
	IV	100,0	+ α-Methyl-Dopa	21,8	IV: I = — 36	0,01
		20,0	+ 5-Hydroxytry.		IV: II = — 26	0,1
					IV:III = +	0,001
2	I	75,0	Evipan	26,2	—	—
	II	100,0	+ α-Methyl-Dopa	22,2	II: I = — 15	0,2
	III	20,0	+ 5-Hydroxytry.	9,0[2]	III: I = — 66	0,01
	IV	100,0	+ α-Methyl-Dopa	23,8	IV: I = — 9	0,5
		20,0	+ 5-Hydroxytry.		IV: II = + 7	0,6
					IV:III = +165	0,02

[1] Starke Exzitation, kein Tier erträgt passive Seitenlage.
[2] Starke Exzitation, 2 Tiere ertragen keine passive Seitenlage.

b) Eine 5-Hydroxytryptophandosis, die nach i.v. Injektion bei Mäusen die Evipannarkose verlängert, führt zu starker Erregung und Narkoseverkürzung, wenn bei den Versuchstieren durch Vorbehandlung mit Iproniazid die Monoaminoxydase des Gehirns blockiert ist (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler). Die unter diesen Versuchsbedingungen auftretende Erregung und Narkoseverkürzung haben wir in dem Sinne gedeutet, daß das aus der leicht ins Gehirn eindringenden Aminosäure (5-Hydroxytryptophan) hier durch Decarboxylierung entstehende Serotonin nicht mehr abgebaut wird und unter Überschreitung der

Bindungskapazität des Gehirns als freies, pharmakologisch wirksames Amin eine narkoseverkürzende „*arousal reaction*" auslöst. Um auszuschließen, daß der Aminosäure selbst die Wirkung zukommt, bot sich auch hier der Versuch mit α-Methyl-Dopa an.

Zwei Versuchsbeispiele sind in der Tab. 5 dargestellt. *Evipan* verursachte bei den Kontrolltieren, die wie alle übrigen mit Iproniazid vorbehandelt waren, in dem einen Versuch eine Narkose von 34,0, in dem anderen von 26,2 min Dauer. *α-Methyl-Dopa* hatte eine leicht erregende Eigenwirkung, die vielleicht die Ursache für die geringe, aber nicht signifikante Narkoseverkürzung ist (29,4 bzw. 22,2 min). Die i.v. Injektion von *5-Hydroxytryptophan* verursacht in Bestätigung unserer früheren Ergebnisse in beiden Versuchen eine starke Erregung, die im Versuch 1 die Narkose (passive Seitenlage) überhaupt nicht zustande kommen ließ, in Versuch 2 ebenfalls bei 2 Tieren den Eintritt der Narkose verhinderte, bei den übrigen die Narkosedauer verkürzte. — Die Tiergruppen IV hatten 10 min vor 5-Hydroxytryptophan (i.v.) 100 mg/kg α-Methyl-Dopa (i.m.) erhalten. In beiden Versuchen war die erregende und narkoseverkürzende Wirkung des 5-Hydroxytryptophans stark abgeschwächt bzw. fast aufgehoben. Das spricht dafür, daß, wie die bronchoconstrictorische (vgl. Abb. 3), so auch die zentralerregende Wirkung, die nach der i.v. Injektion von 5-Hydroxytryptophan auftritt, nicht durch die Aminosäure selbst, sondern durch das aus ihr gebildete Serotonin verursacht ist. Es ist ein weiterer Beweis dafür, daß α-Methyl-Dopa auch in vivo nicht nur die Dopamin-, sondern auch die Serotoninbildung blockiert, und macht wahrscheinlich, daß die beiden Aminosäuren — Dopa und 5-Hydroxytryptophan — durch ein und dasselbe Enzym decarboxyliert werden.

Summary

1. *5-Hydroxytryptophan* is decarboxylated in the body to serotonin only at sites at which *dopa* is decarboxylated to dopamine. E. g., extracts of *adrenal medulla*, of *pheochromocytoma*, and of postganglionic *sympathetic nerves* (splenic nerves), which do not contain serotonin, decarboxylate not only dopa but also 5-hydroxytryptophan. Extracts of rabbit's cecum and colon, which do not contain dopa decarboxylase, do not decarboxylate 5-hydroxytryptophan.

2. The ratio of enzymatic *activity* towards the two amino acids differs from organ to organ. The reason is the different content of coenzyme in the extracts, since addition of pyridoxal-5-phosphate eliminates the difference.

3. The *catechol* derivates (dopa, dopamine) inactivate the coenzyme (pyridoxal-5-phosphate) much faster than do the *indole* derivates (5-hydroxytryptophan, serotonin).

4. *α-methyldopa*, a competitive inhibitor of dopadecarboxylase, also inhibits the decarboxylation of 5-hydroxytryptophan. This inhibition is demonstrable in vivo as follows:

a) The intravenous injection of 5-hydroxytryptophan causes a prolonged *bronchoconstriction* in guinea pigs;

b) 5-hydroxytryptophan causes *central excitation* in mice and shortens anesthesia if the monoaminoxydase of the brain is blocked by iproniazid;

c) both effects — bronchoconstriction and central stimulation — are prevented by pretreatment of the animals with α-methyldopa.

5. It is, therefore, concluded that bronchoconstriction and central excitation, which occur following the injection of 5-hydroxytryptophan, are caused not by the amino acid itself but by serotonin which originates from decarboxylation. Furthermore, "5-hydroxytryptophan decarboxylase", which is blocked by a competitive inhibitor of dopa decarboxylase — α-methyldopa —, possibly is identical with dopa decarboxylase.

Literatur

Balzer, H., K. Greeff u. E. Westermann: Klin. Wschr. **1956**, 1204.

Balzer, H., u. P. Holtz: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 547 (1956).

Burger, M., u. H. Langemann: Klin. Wschr. **1956**, 941.

Clark, C. T., H. Weissbach and S. Udenfriend: J. biol. Chem. **210**, 139 (1954).

Comroe, J. H., B. van Lingen, R. C. Stroud and A. Roncoroni: Amer. J. Physiol. **173**, 379 (1953).

Dengler, H., u. G. Reichel: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 324 (1957).

Gaddum, J. H., and N. J. Giarman: Brit. J. Pharmacol. **11**, 88 (1956).

Heyl, D., E. Luz, S. A. Harris and K. Folkers: J. Amer. chem. Soc. **74**, 414 (1952).

Holtz, P., R. Heise u. K. Lüdtke: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **191**, 87 (1938).

Holtz, P., u. F. Bachmann: Naturwissenschaften **39**, 116 (1952).

Holtz, P., H. Balzer, E. Westermann u. E. Wezler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 333 (1957).

Holtz, P., H. Balzer u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. (im Druck).

Holtz, P., u. K. Credner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **200**, 356 (1942). — Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **280**, 1 (1943).

Holtz, P., K. Credner u. H. Walter: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **262**, 111 (1939).

Holtz, P., R. Heise u. W. Spreyer: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **188**, 580 (1938).

Holtz, P., u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 538 (1956); **231**, 311 (1957).

Konzett, H.: Brit. J. Pharmacol. **11**, 289 (1956).

Konzett, H., u. R. Rössler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **195**, 71 (1940).

Kottegoda, S. R., and H. Mott: Brit. J. Pharmacol. **10**, 66 (1955).
Langemann, H.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 318 (1951). — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 244 (1956).
Reid, G., and M. Rand: Nature (Lond.) **169**, 801 (1952).
Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 566 (1956).
Schott, H. F., and W. G. Clark: J. biol. Chem. **196**, 449 (1952).
Sourkes, T. L.: Arch. Biochem. **51**, 444 (1954).
Udenfriend, S., C. T. Clark and E. Titus: J. Amer. chem. Soc. **75**, 501 (1953). — Fed. Proc. **12**, 282 (1953).
Westermann, E.: Biochem. Z. **328**, 405 (1957).
Westermann, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 518 (1958).

Priv.-Doz. Dr. E. Westermann, Pharmakologisches Institut der Universität, Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str. 14

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 206—209 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die Hemmung der Dopa-Decarboxylase durch Isonicotinsäurehydrazid*

Von
D. Palm

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. März 1958)

Es ist bekannt, daß Isonicotinsäurehydrazid (INH) neurotoxische Wirkungen (periphere Neuritiden und Krämpfe) besitzt. Die Erscheinungen sind mit Vitamin B_6 (Pyridoxin und Pyridoxal-5-Phosphat) therapeutisch beeinflußbar (Vilter, Biehl, Müller u. Friedmann; Reilly, Killam, Jenney u. Marshall).

Untersuchungen über den Angriffspunkt der INH-Wirkung haben ergeben, daß Fermente gehemmt werden, deren Coferment Pyridoxal-5-Phosphat (Py) ist (Yoneda u. Asano; Davison; Hicks u. Cymerman-Craig; Youatt; Canal u. Garattini). Entgegen der ursprünglichen Annahme einer kompetitiven Hemmung am Apoferment konnte Davison zeigen, daß die Hemmwirkung auf der Bildung eines Pyridoxal-5-Phosphat-Isonicotinyl-Hydrazons (Py-INH) beruht.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von INH auf die Dopa-Decarboxylase untersucht, die auch im Nerven vorkommt (Holtz u. Westermann 1956) und deren Coferment Pyridoxal-5-Phosphat ist.

Methodik

Für die Versuche wurde ein Dopa-Decarboxylase-Trockenpräparat (Holtz u. Westermann 1957) verwendet: Schweinenierenrinde wird homogenisiert und 2 Std unter Eiskühlung mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:3 extrahiert. Nach Abzentrifugieren wird der Überstand 3mal mit Bolus alba DAB 6 1 g/10 ml Extrakt ausgeschüttelt und jeweils wieder abzentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wird 30 Std gegen Aqua dest. bei +3° C dialysiert. Der Dialyserückstand wird abzentrifugiert, der Überstand lyophilisiert. Das cofermentarme und daher gut mit Py aktivierbare Präparat zeigte über Wochen konstante Fermentaktivität (Aufbewahrung bei +3° C über P_2O_5).

Die Dopa-Decarboxylase-Aktivität wurde durch manometrische Bestimmung der aus L-3,4-Dioxyphenylalanin freigesetzten CO_2-Menge in der Warburg-Apparatur gemessen. Die angegebenen CO_2-Werte wurden auf CO_2-Retention korrigiert. Eine entsprechende Eichkurve wurde durch Einkippen von 0,2 ml 3 n H_2SO_4 auf verschiedenen Niveaus des untersuchten Decarboxylierungsbereichs erhalten. N_2-Atmosphäre, 37° C, p_H 6,8.

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Versuchsansätze: 5 mg Ferment (gelöst in 2 ml 0,067 m Phosphatpuffer p_H 6,8 und Coferment (Py) bzw. Inkubat (Py-INH) werden in den Hauptraum gegeben; in den Seitenarm 2 mg L-Dopa (0,4 ml). Das Gesamtvolumen wurde jeweils auf 3 ml aufgefüllt.

Ergebnisse

1. Aus der Abb. 1 ist zu ersehen, daß die nur schwache Decarboxylierung von Dopa durch das cofermentarme Trockenpräparat (25 μl CO_2; K) bei Zusatz von 6,25 μg Py[1] auf fast 130 μl CO_2 (*I*) gesteigert wird (Ablesung nach 80 min). Gibt man Py in den Hauptraum des Warburg-Gefäßes und kippt bei Versuchsbeginn aus dem Seitenarm INH ein, so ist dieses ohne Einfluß auf Ablauf und Ausmaß der Decarboxylierung (*VII*). Die Vorinkubation von Py mit Dopa führt unter Ausbildung einer Schiffschen Base mit anschließender Umlagerung zu einem Tetrahydro-Isochinolin-Derivat (Heyl, Luz, Harris u. Folkers; Schott u. Clark; Holtz u. Westermann 1957) zur Inaktivierung des Coferments. Das Inkubat Py-Dopa aktiviert die Decarboxylierung nicht nennenswert (*IV*). Inkubiert man jedoch Py mit INH und gibt das Inkubat in den Hauptraum, so erfährt sowohl der Verlauf als auch das Ausmaß der Decarboxylierung eine charakteristische

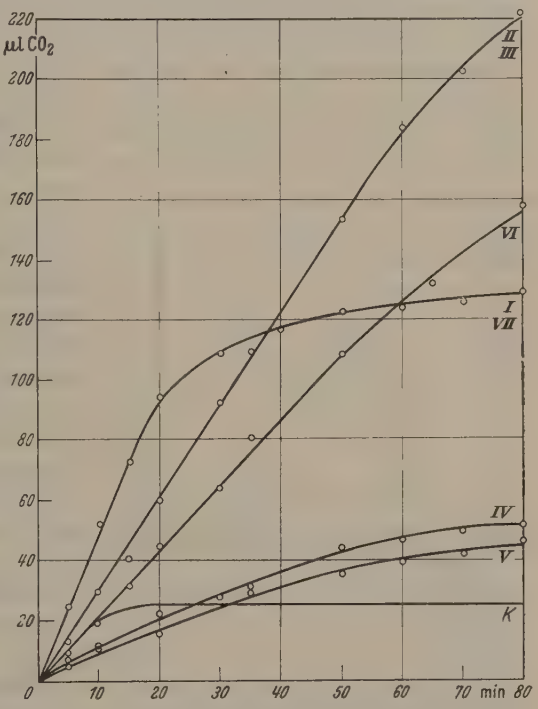


Abb. 1. *Cofermentwirksamkeit von Pyridoxal-5-Phosphat, sowie von Inkubaten mit INH und Dopa.* Inkubationsansätze: Es wurden gelöst in 0,3 ml 0,067 m Phosphatpuffer p_H 6,8: *I* 0,4 μm Py. — *II* 0,4 μm Py + 1,2 μm INH. Inkubationszeit 30 min. — *III* Wie *II*, jedoch nach Zusatz von 1,2 μm Dopa weitere Inkubation von 30 min Dauer. — *IV* 0,4 μm Py + 1,2 μm Dopa. Inkubationszeit 30 min. — *V* Wie *IV*, jedoch nach Zusatz von 1,2 μ m INH weitere Inkubation von 30 min Dauer. — *VI* 0,4 μm Py + 1,2 μm INH + 1,2 μm Dopa. Inkubationszeit 30 min. Die Inkubation erfolgte bei 37° C in N_2-Atmosphäre. Die Inkubate wurden nach Ablauf der Reaktionszeit auf 3,2 ml Phosphat puffer aufgefüllt. Je 0,2 ml der Lösungen wurden in den Hauptraum der Warburg-Gefäße gegeben. Die Endkonzentrationen betrugen: $8{,}4 \cdot 10^{-6}$ m Py und $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ m INH. In Ansatz *VII* wurde Py in den Hauptraum gegeben und INH aus dem Seitengefäß bei t_0 zugekippt. — *K* Versuchsansatz ohne Coferment. — Nach Temperaturausgleich (15 min) wurde aus dem Seitenarm der Warburg-Gefäße 2 mg L-Dopa (0,4 ml) zugekippt

[1] Der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach/Baden sind wir für die Überlassung von Pyridoxal-5-Phosphat zu Dank verpflichtet.

Änderung (*II*): Die Dopa-Decarboxylierung wird zwar nicht schon gleich zu Anfang so stark aktiviert wie mit reinem Py (*I*), sie verläuft jedoch stetiger, in dem sie nicht wie in *I* schon nach 15 min merklich nachläßt, sondern in linear verlaufender Reaktion mit konstanter Reaktionsgeschwindigkeit zu fast quantitativer Decarboxylierung der eingesetzten Substratmenge führt.

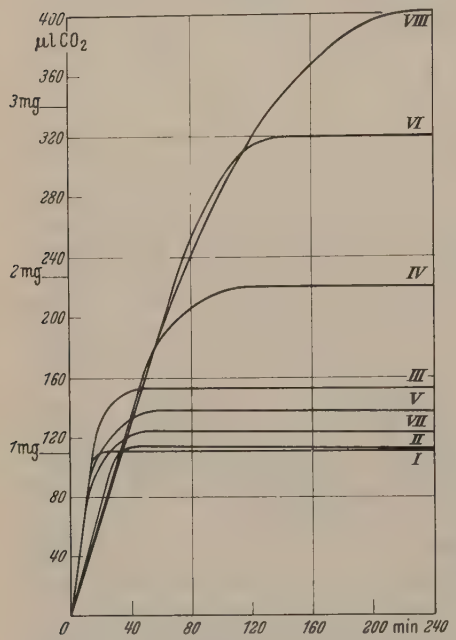


Abb. 2. *Cofermentwirksamkeit von Py und Py-INH (krist. Verbindung) bei steigendem Substratangebot.* Endkonzentrationen von Py bzw. Py-INH im Hauptraum: $8{,}4 \cdot 10^{-6}$ m. Seitengefäße: 1—4 mg L-Dopa in 0,8 ml. *I* Py/1 mg Dopa. — *II* Py-INH/1 mg Dopa. — *III* Py/2 mg Dopa. — *IV* Py-INH/2 mg Dopa. — *V* Py/3 mg Dopa. — *VI* Py-INH/3 mg Dopa. — *VII* Py/4 mg Dopa. — *VIII* Py-INH/4 mg Dopa

Dies läßt sich sonst bei gleicher Apofermentmenge nur durch Zugabe weit höherer Cofermentmengen erreichen.

Vorinkubation von Py mit INH schützt das Coferment bei anschließender Inkubation mit Dopa vor der sonst erfolgenden Inaktivierung (*III*). Auch bei gleichzeitiger Inkubation aller 3 Komponenten, Py, INH und Dopa, übt INH eine, wenn auch schwächere Schutzwirkung aus (*VI*).

2. Die Abb. 2 stellt Versuche dar, in denen aus Py-INH-Lösungen gewonnenes kristallines Reaktionsprodukt den Versuchsansätzen zugesetzt und die Cofermentwirksamkeit mit der des reinen Py bei steigenden Substratmengen verglichen wurde. Über die Darstellung und Eigenschaften des im UV-Licht stark fluorescierenden Reaktionsprodukts wird an anderer Stelle berichtet.

In den Versuchsansätzen mit reinem Py (Abb. 2, Nr. *I*, *III*, *V*, *VI*) kommt die Substrathemmung zum Ausdruck, die auf einer das Coferment inaktivierenden Reaktion zwischen Py und Dopa beruht. In den Versuchsansätzen mit 3 und 4 mg Dopa (*V* und *VII*) ist die Decarboxylierung geringer als in dem nur 2 mg Dopa enthaltenden Ansatz *III*. 1 mg Dopa wird noch quantitativ decarboxyliert. Demgegenüber nimmt die Decarboxylierung in den Ansätzen, die das Py-Isonicotinyl-Hydrazon enthalten, mit steigender Substratmenge zu (*II*, *IV*, *VI*, *VIII*).

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen

Auf Grund des von Metzler, Ikawa u. Snell angegebenen Mechanismus der Decarboxylierung ist anzunehmen, daß INH durch Reaktion

mit der Aldehydgruppe das Pyridoxal-5-Phosphates das Coferment zunächst blockiert und dadurch die Decarboxylierungsreaktion hemmt. Die Hemmung ist aber reversibel, da das Reaktionsprodukt zwischen INH und Py —, Py-Isonicotinylhydrazon —, offensichtlich hydrolytisch aufgespalten wird. In dem Maße, in dem die Hydrolyse erfolgt, wird aktivierendes Coferment (Py) frei. Durch die reversible Bindung an INH wird Py vor der sonst schnell erfolgenden irreversiblen Inaktivierung durch Dopa und Dopamin (Schiffsche Base → Tetrahydro-Isochinolinderivat) geschützt. Das Py-Isonicotinylhydrazon stellt sozusagen eine Depotform des Coferments dar, in der dieses vor Inaktivierung durch Substrat und Reaktionsprodukt geschützt ist und aus der es durch Hydrolyse allmählich freigesetzt wird. Die hydrolytische Aufspaltung der „Depotform" als langsamster Vorgang bestimmt die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion: die Decarboxylierung von Dopa verläuft deshalb in Gegenwart von Py-INH zwar langsamer als mit reinem Py, dafür aber stetiger und führt zu einer quantitativen Decarboxylierung der angebotenen Substratmengen.

Summary

1. Isonicotinyl hydrazide inhibits the activity of dopa-decarboxylase by blocking the co-enzyme pyridoxal-5-phosphate.

2. Pyridoxal-5-phosphate isonicotinyl hydrazone is obtained on incubation of pyridoxal-5-phosphate with isoniazid; in this form the co-enzyme is protected against inactivation by dopa and dopamine, but will be released by slow hydrolysis. Protection and slow release of pyridoxal phosphate may explain why in the presence of pyridoxal phosphate isonicotinyl hydrazone the decarboxylation is slower than in the presence of pure pyridoxal phosphate. On the other hand, there is a practically complete decarboxylation of the substrate which is not found with pyridoxal phosphate alone.

Literatur

Canal, N., u. S. Garattini: Arzneimittel-Forsch. **7**, 158 (1957).
Davison, A. N.: Biochim. biophys. Acta **19**, 131 (1956).
Heyl, D., E. Luz, S. A. Harris and K. Folkers: J. Amer. chem. Soc. **74**, 414 (1952).
Hicks, R. M., and J. Cymerman-Craig: Biochem. J. **67**, 353 (1957).
Holtz, P., u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 538 (1956); **231**, 311 (1957).
Metzler, D. E., M. Ikawa and E. E. Snell: J. Amer. chem. Soc. **76**, 648 (1954).
Reilly, R. H., K. F. Killam, E. H. Jenney and W. H. Marshall: J. Amer. med. Ass. **152**, 1317 (1957).
Schott, H. F., and W. G. Clark: J. biol. Chem. **196**, 449 (1952).
Vilter, R. W., I. P. Biehl, J. F. Müller and B. J. Friedmann: Fed. Proc. **13**, 776 (1954).
Yoneda, M., and N. Asano: Science **117**, 803 (1953).
Youatt, J.: Biochem. J. **68**, 193 (1958).

Dr. D. Palm, Pharmakologisches Institut der Universität, Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str. 14

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 210—219 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Über die Atemlähmung durch Parathion oder Paraoxon und ihre antagonistische Beeinflußbarkeit

Von
F. Sakai*, H. dal Ri, W. D. Erdmann und G. Schmidt

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 13. Februar 1958)

Bei der akuten Vergiftung des Warmblüters mit Cholinesterasegiften aus der Gruppe der Alkylphosphate treten schon in Dosen ab $^1/_2$ LD 50 schwere Zustände von Atemnot auf (Paulet 1956). Die Atemschädigung scheint der Kreislaufschädigung stets voranzugehen (Salerno u. Coon 1949) und bei allen experimentell geprüften Alkylphosphaten die entscheidende Todesursache zu sein (Frawley u. Mitarb. 1952). Nach Holmstedt (1951) sowie De Candole u. Mitarb. (1953) sind an der tödlichen Atemlähmung drei Faktoren beteiligt: Bronchospasmus, neuromuskuläre Lähmung (der Atemmuskulatur) und zentrale Atemlähmung (vgl. auch Übersicht bei Erdmann u. Lendle 1958).

Der Behandlungserfolg bei schweren Alkylphosphatvergiftungen hängt weitgehend davon ab, ob es gelingt, die Atemlähmung zu verhüten oder aufzuheben. Seit der Entdeckung der parasympathikomimetischen (esterasehemmenden) Eigenschaften der Alkylphosphate steht das Atropin als symptomatischer Antagonist (des Acetylcholin) bei Alkylphosphatvergiftungen im Mittelpunkt der medikamentösen Therapie. Neuerdings scheint aber auch eine kausale Behandlung mit den spezifischen Esterase-Reaktivatoren von Wilson (Übersicht bei Kewitz 1957), wie z. B. mit Pyridin-2-aldoxim-methjodid (PAM) möglich zu sein. (Erfahrungen am Menschen: Hiraki u. Namba 1957). Im Hinblick auf die durch Alkylphosphate bewirkte Atemschädigung wird man annehmen dürfen, daß bronchospastische Wirkungen (durch Atropin oder PAM) und neuromuskulär lähmende Wirkungen (durch PAM, nicht durch Atropin) pharmakologisch beherrscht werden können. Dagegen scheint nach mehreren Literaturangaben und unseren eigenen Erfahrungen die zentrale Atemlähmung weder durch Atropin (für E 605 bzw. E 600: Erdmann, Kempe u. Lühning 1955, Paulet 1956) noch durch PAM (für Parathion, Paraoxon und DFP: Bethe, Erdmann, Lendle u.

* Prof. Dr. F. Sakai (Tokio), Stipendiat der A. v. Humboldt-Stiftung.

Schmidt 1957; für Sarin und Tabun: Wills, Kunkel, Brown u. Groblewski 1957) verhütet oder aufgehoben werden zu können. Nicht der medikamentösen Behandlung, sondern der künstlichen Beatmung kommt hier als lebensrettender Maßnahme die größte Bedeutung zu (Bethe, Erdmann, Lendle u. Schmidt 1957).

Als Erklärung für das Fehlen eines Antidoteffektes von Atropin und PAM gegenüber zentral lähmenden Alkylphosphat-Wirkungen bieten sich mehrere Möglichkeiten an, z. B. die bekanntlich geringe Antinicotinwirkung von Atropin oder etwa das mangelnde Eindringungsvermögen von PAM durch die Blut-Hirnschranke (vgl. Kewitz u. Nachmansohn 1957). Diese wie auch andere Deutungen gehen von der Voraussetzung aus, daß die zentral lähmenden Wirkungen der Alkylphosphate ursächlich auf eine Esterasehemmung im ZNS, d. h. auf eine (extreme?) Acetylcholinwirkung zurückzuführen sind, was jedoch bis heute nicht erwiesen ist (vgl. z. B. Paulet 1956 u. a.). Es erscheint somit berechtigt zu fragen, ob die zentrale Atemlähmung bei der Alkylphosphat-Vergiftung nicht auf eine unspezifische Wirkung dieser Esteraseblocker zurückgeführt werden kann, wie sie beispielsweise am isolierten Darmstreifen nachzuweisen ist (Erdmann u. Heye 1957).

Unsere experimentellen Untersuchungen sollten den Mechanismus der atemlähmenden Wirkung von Parathion und seinem Oxydationsprodukt Paraoxon klären sowie die Eignung der Antidote Atropin und PAM gegen die an der Atemlähmung beteiligten Funktionsstörungen ermitteln. Es sollte insbesondere geprüft werden, ob etwa auch eine unspezifische medikamentöse Behandlung die durch diese Alkylphosphate herbeigeführte zentrale Atemlähmung zu durchbrechen vermag.

Methodik

Als Versuchstiere dienten betäubte oder decerebrierte Katzen und Ratten. Die methodischen Einzelheiten werden jeweils vor den Befunden mitgeteilt.

Folgende Substanzen wurden von uns verwendet:

1. Zur Vergiftung. Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (Parathion, E 605)[1]. Der Wirkstoff wurde 1%ig in absolutem Alkohol gelöst und mit Adhägon[2] (0,5%)-Ringer-Lösung zur gebrauchsfertigen Injektionslösung weiterverdünnt.

Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat (Paraoxon, E 600)[1]. Der Wirkstoff wurde 10%ig in absolutem Alkohol gelöst und mit Ringer-Lösung zur gebrauchsfertigen Injektionslösung weiterverdünnt.

2. Zur Gegenbehandlung. Pyridin-2-aldoxim-methjodid (PAM)[1] als 1%ige Lösung.

Atropin. sulf. 10^{-2} und 10^{-4}.

Pentamethylentetrazol (Cardiazol) 10^{-1} und 10^{-2}.

---

[1] Für die Überlassung der Substanzen danken wir den Herren Dr. G. Schrader u. Prof. Dr. med. et phil. W. Wirth-Elberfeld.

[2] Adhägon (Fa. Heyden) ist ein indifferentes Eiweißabbauprodukt und als Stabilisator für feindisperse Suspensionen geeignet.

Nach Versuchsende wurde einzelnen Tieren das Kleinhirn entnommen und die Esteraseaktivität in einer modifizierten Methode nach Ammon (1934) ermittelt (Näheres bei Friedberg u. Sakai 1958).

Ergebnisse

A. Versuche an Katzen

Die Versuche wurden an 12 mit Chloralose(0,06 g/kg)-Urethan (0,25 g/kg) betäubten und an 4 decerebrierten Katzen im Gewicht von 1,5—4,3 kg durchgeführt. Versuchsbeginn: jeweils 2—3 Std nach Operationsende.

Die Atemexkursionen wurden mit einer Mareyschen Kapsel (im Nebenschluß der Trachealkanüle) und das Atemvolumen mit der Gasuhr nach Gildemeister am Russkymographen registriert. Über eine Kanüle in einer A. carotis comm. wurde außerdem der arterielle Blutdruck aufgezeichnet. Zur Verhinderung der Blutgerinnung war das Registriersystem mit Heparin-Ringer-Lösung gefüllt. Sämtliche geprüften Substanzen wurden — wenn nicht ausdrücklich anders angegeben — in eine V. jugularis ext. injiziert oder infundiert.

In vorangegangenen Versuchen an betäubten und decerebrierten Katzen (Erdmann, Kempe u. Lühning 1955) hatte sich gezeigt, daß die fraktionierte i.v. Injektion oder i.v. Infusion von Parathion oder seinem Oxydationsprodukt Paraoxon über eine Atmungserregung (und Blutdruckerhöhung) zur tödlichen Atemlähmung führt. Durch Atropin (1 mg/kg i.v.) ließ sich die Atemerregung, nicht aber die Atemlähmung aufheben (Erdmann, Kempe u. Lühning 1955, Abb. 2). Es wurde jetzt in der gleichen Versuchsanordnung geprüft, ob das spezifische Antidot PAM die durch Parathion oder Paraoxon bewirkte Atmungslähmung zu beeinflussen vermag: Bei lebensbedrohlichem Absinken des Atemminutenvolumens wurde PAM (30—50 mg/kg) i.v. injiziert. In den meisten Fällen wird die — von einem Absinken des Blutdrucks begleitete — Atemlähmung nicht verhindert oder aufgehoben, auch nicht, wenn sich eine flüchtige Besserung der Kreislaufverhältnisse zeigt (6 Versuche an betäubten Katzen: 4 mit Parathion, 2 mit Paraoxon; 3 Versuche an decerebrierten Katzen: 1 mit Parathion, 2 mit Paraoxon). In 6 Versuchen dagegen führte PAM (1—2 · 30 mg/kg i.v.) zu einer schnellen Wiederkehr der normalen Atemleistung und zu starkem Anstieg des Blutdrucks (3 Versuche mit Parathion an betäubten Katzen, 2 Versuche mit Paraoxon an der betäubten und 1 an der decerebrierten Katze).

Zweifellos vermag PAM die durch Alkylphosphate blockierte Cholinesterase auch in vivo zu reaktivieren (histochemischer Nachweis von Koelle 1957). Es ist deshalb anzunehmen, daß die immerhin in einigen Versuchen zu beobachtende Antidotwirkung von PAM gegen eine drohende Atemlähmung nach Injektion von Parathion oder Paraoxon auf einer Reaktivierung der blockierten Esterase beruht. Die Aktivität der Hirnesterase (Kleinhirn-Homogenat, Bestimmung nach Ammon) betrug jedoch auch in den Versuchen mit gutem Antidoteffekt von PAM

weniger als 30% der Kontrollen und war in vitro durch PAM-Zusatz ($1 \cdot 10^{-3}$) wiederherzustellen. Der Befund bestätigt die an Mäusen durchgeführten Versuche von Kewitz u. Nachmansohn (1957) sowie Hobbiger (1957) und läßt darauf schließen, daß PAM bei der Injektion in vivo das ZNS nicht erreicht (Bluthirnschranke!). Es muß deshalb der gelegentlich beobachtete Antagonismus von PAM gegen die Vergiftung mit Parathion oder Paraoxon peripher lokalisiert sein, d. h. die Atemlähmung müßte in diesen Fällen auf einer neuromuskulären Lähmung und/oder einem Bronchospasmus beruht haben.

Die zentrale Atemlähmung wird durch PAM offenbar kaum beeinflußt. Es wäre aber denkbar, daß bei intrazisternaler Injektion von PAM auch die zentralen Atemwirkungen der Alkylphosphate beeinflußt werden könnten. Das ist jedoch nicht der Fall: Trotz genügend langer (15—20 min) Überlebenszeit (Reaktivierungszeit!) wurde die durch Alkylphosphate bewirkte Atemschädigung durch die intrazisternale Injektion von PAM (10 mg) verstärkt und nicht etwa aufgehoben (3 Versuche). Die Esteraseaktivität des anschließend entnommenen Kleinhirns betrug in diesen Versuchen 40—70% der Normalaktivität, eine Teilreaktivierung scheint also stattgefunden zu haben (vgl. die oben angegebenen Werte). Die Folgerung, daß die zentrale Atemlähmung nach Alkylphosphaten eine von der Hemmung der Hirnesterase unabhängige Wirkung darstellt, ist ohne Kenntnis der Eigentoxicität von PAM bei intrazisternaler Injektion sicher nicht berechtigt. In der Tat führte die intrazisternale Injektion von 10 mg PAM an einem nicht betäubten Kaninchen innerhalb von 15 min zum Tod durch Atemlähmung.

Die hier wiedergegebenen Versuche an Katzen haben einige Hinweise über den Mechanismus der durch Alkylphosphate ausgelösten Atemschädigung ergeben. Zur Klärung der noch offengebliebenen Fragen erschienen jedoch oscillographische Methoden wesentlich besser geeignet. Aus technischen Gründen wurden für diese Versuche Ratten verwendet.

B. Versuche an Ratten

Die Versuche wurden an 4 mit Urethan (1,2 g/kg) betäubten und an 4 decerebrierten Ratten im Gewicht von 280—350 g durchgeführt. Die Decerebrierung erfolgte in Äthernarkose (nach Unterbindung beider Carotiden und rechtsseitiger Vagotomie) durch Einführen starker Celluloidstreifen in etwa 1 mm breite Fräs(„schnitte der Schädeldecke. Nach Versuchsende wurde die richtige Lage des Decerebrierungsschnittes autoptisch kontrolliert.

Mit der oscillographischen Registrierung wurde etwa 3 Std nach Beendigung der Inhalationsnarkose begonnen. Registriert wurden:

1. Die Aktionspotentiale des li. zentralen Phrenicusstumpfes. Der li. N. phrenicus wurde am Halse bis zur Eintrittsstelle in den Brustraum im Paraffinbad präpariert und so weit peripher wie möglich durchtrennt. Das Potential wurde mit Hilfe von Häkchenelektroden (Platin) bipolar abgeleitet und einem

4stufigen Differentialverstärker zugeführt. Ein mehrkanaliger Direktschreiber („Oscilloscript[1]", Fa. Philips) zeichnete das 1 : 300000 verstärkte Aktionsstrombild auf (Sichtkontrolle an einem parallel geschalteten Oscillographen[1]).

2. Die Aktionspotentiale der rechten Diaphragma-Hälfte. Der Bauchraum wurde in Höhe des Rippenbogens eröffnet. Nadeleinstichelektroden (Platin) leiteten das Aktionspotential der rechten Zwerchfellhälfte dem 2. Kanal des Direktschreibers zu. Die Verstärkung betrug 1 : 30000.

3. Die mechanischen Thoraxexkursionen. Ein aktiver und ein passiver Dehnungsmeßstreifen wurden auf eine weiche, einseitig fixierte Blattfeder aufgeklebt. Das freie Ende der Feder lagerte mit einem Druck von etwa 5 g auf dem Schwertfortsatz des Brustbeins. Die durch Atembewegungen ausgelöste Verbiegung der Feder führt zu einer Widerstandsänderung der Meßstreifen, die mit einer Trägerfrequenzmeßbrücke (PR 9300, Fa. Philips[1]) gemessen und im 3. Kanal des Direktschreibers aufgezeichnet wurde.

Sämtliche Tiere wurden vor Versuchsbeginn atropinisiert (0,5 mg/kg) und während des ganzen Versuches künstlich beatmet. Die Atropinisierung sollte eventuellen muscarinartigen Wirkungen von Paraoxon[2] (Blutdrucksenkung[3], Bronchospasmus) vorbeugen, die fortlaufende künstliche Beatmung sollte etwaige auf Sauerstoffmangel zu beziehende Effekte verhüten.

Die geprüften Substanzen wurden in eine V. femoralis injiziert oder infundiert (elektrisches Infusionsgerät der Fa. Braun[1], Melsungen).

Die angegebene Versuchsanordnung gestattet die getrennte Beurteilung zentraler (Phrenicusimpulse) und peripherer Effekte (Diaphragmaaktion) auf die Atmung (vgl. auch Douglas u. Matthews 1952, sowie Schaumann u. Job 1958).

Sowohl an betäubten Ratten (4 Versuche) als auch an decerebrierten Ratten (4 Versuche) führt die i.v. Injektion von 0,1—0,3 mg/kg Paraoxon zu einer peripheren Atemlähmung: die Aktionspotentiale des Diaphragmas und die aktiven Thoraxexkursionen verschwinden bei noch deutlich erhaltenen Phrenicussalven (Abb. 1 b). Eine zu diesem Zeitpunkt erfolgende i.v. Injektion von PAM (15—30 mg/kg) hebt diese periphere Atemlähmung auf (Abb 1 c). Bei weiterer i.v. Applikation von Paraoxon (1,0—3,0 mg/kg als fraktionierte Injektionen oder Dauerinfusion) tritt erneut eine Atemlähmung auf: die Aktionspotentiale des Zwerchfells sowie die aktive Atmung fallen aus, gefolgt von einem Verschwinden der Phrenicusimpulse (Abb. 1 d). Diese zentrale Atemlähmung läßt sich durch weitere Injektionen von PAM nicht, wohl aber durch i.v. Injektion

---

[1] Für die Überlassung des Gerätes als Leihgabe danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[2] Die Giftwirkung von Parathion soll auf seiner oxydativen Umwandlung („Konversion") in Paraoxon beruhen (Diggle u. Gage 1951, Davison 1955, Kubistova 1956). Es wurde daher in diesen Versuchen lediglich Paraoxon zur Vergiftung der Tiere verwendet.

[3] Nach Untersuchungen von Dirnhuber u. Cullumbine (1955) sowie Hornykiewicz u. Kobinger (1956) führen cholinesterasehemmende Substanzen an der Ratte allerdings ausschließlich zu Blutdrucksteigerungen.

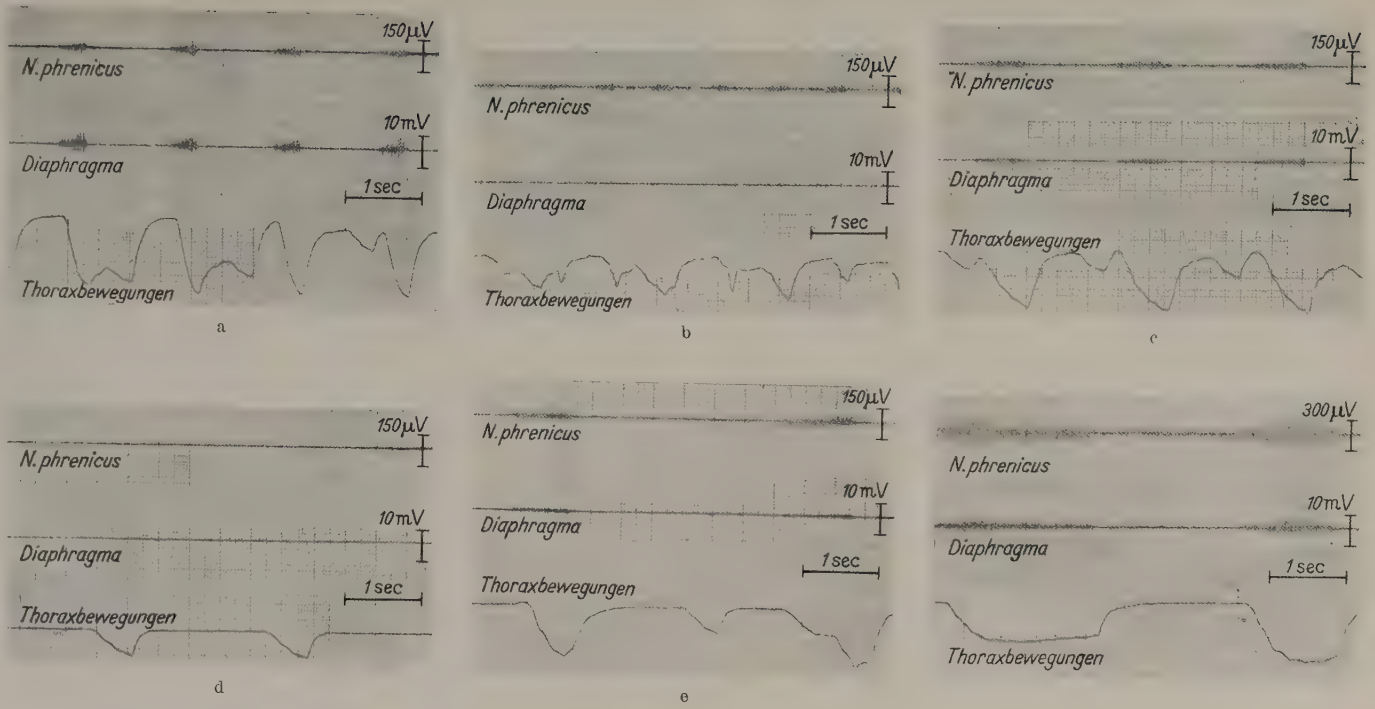


Abb. 1. Ratte, decerebriert, 290 g. Atropinisiert (0,5 mg/kg i.m.) und künstlich beatmet. Registrierung der elektrischen Phrenicus- und Zwerchfellaktivität sowie der mechanischen Thoraxbewegungen. a Vor der Vergiftung durch Paraoxon; b 3 min nach 0,1 mg/kg Paraoxon i.v., periphere Atemlähmung; c 9 min nach 15 mg/kg PAM i.v., Aufhebung der peripheren Atemlähmung; d nach 60 min Paraoxon-Infusion (insges. 1,14 mg/kg i.v.), zentrale Atemlähmung; e 2 min nach 15 mg/kg Cardiazol i.v., Aufhebung der zentralen Atemlähmung; f 60 min später (nach insges. 55 mg/kg Cardiazol i.v.), Spontanatmung

von Cardiazol (15—25 mg/kg) aufheben[1]. Danach kommt die aktive Atmung bei allerdings stark verlängerter Inspiration und verlangsamter Frequenz wieder in Gang (Abb. 1e). Nach hohen Cardiazoldosen kann sogar auf weitere künstliche Beatmung verzichtet werden (Abb. 1f).

In einigen Versuchen wurde nach Versuchsende das Kleinhirn entnommen. Die nach Ammon ermittelte Aktivität der Hirnesterase war extrem gering (weniger als 10% der Normalaktivität) und durch Zusatz von PAM ($1 \cdot 10^{-3}$) auf etwa 50% zu erhöhen („Reaktivierung"). Obwohl die Hirnesterase stark gehemmt war, konnte die zentrale Atemlähmung durch Cardiazol aufgehoben werden. Die Atemlähmung scheint demnach auf einem esteraseunabhängigen Effekt des Alkylphosphates zu beruhen.

Diskussion

Die durch Alkylphosphate bewirkte Atemlähmung ist wohl zuerst von Holmstedt (1951), später von De Candole u. Mitarb. (1953) und zuletzt von Schaumann u. Job (1958) als Produkt von zentral und peripher lähmenden Wirkungen erkannt worden. Es gilt dies — wie auch unsere Versuche an Ratten und Katzen zeigen — prinzipiell für den Warmblüter, wobei allerdings der jeweilige Anteil von zentralen und peripheren Wirkungen mit der Tierspezies, aber auch mit dem jeweils verwendeten Alkylphosphat wechselt (De Candole u. Mitarb. 1953). Von praktischer Bedeutung ist, daß sich die partiellen Schädigungen zentraler und peripherer Atemfunktionen addieren. Die Beseitigung allein der partiellen neuromuskulären Lähmung (PAM) kann zu diesem Zeitpunkt die Atemlähmung ebenso verhindern oder beseitigen (vgl. Abb. 1b u. c), wie es zweifellos auch eine Beseitigung der partiellen zentralen Lähmung (z. B. durch Cardiazol, unveröffentlichte Versuche) vermag.

Dieses Phänomen hängt eng mit den von Vulpian (1882) beschriebenen Erscheinungen bei partieller Curarisierung[2] zusammen und beruht darauf, daß zwischen der Anzahl erregter Nervenfasern (bzw. motorischer Endplatten) und der mechanischen Muskelleistung keine lineare Beziehung besteht (Näheres bei Erdmann 1956). Das geht auch aus dem S. 214 (unten) beschriebenen Befund hervor, daß nämlich bei der kontinuierlichen Abnahme der Phrenicus-Impulse die elektrische und mechanische Zwerchfellaktivität noch vor der völligen zentralen Lähmung zu erlöschen pflegt.

In unseren Versuchen wurden die Phrenicus-Potentiale als Ausdruck der zentralen Aktivität angesehen, und ihr Verschwinden somit als Folge einer zentralen Atemlähmung aufgefaßt. Murtha, McNamara u. Mitarb.

[1] Durch Atropin (geprüft bis 50 mg/kg i.v.) konnte die zentrale Atemlähmung nicht aufgehoben werden.

[2] Sogenannter *Vulpian-Effekt:* bei einem bestimmten Ausmaß der Curarisierung fällt die physiologisch innervierte Willkürmotorik aus, obwohl der Erfolg einer indirekten, supramaximalen Reizung noch nicht wesentlich vermindert ist.

(1955) haben nach hohen Dosen des Alkylphosphates TEPP eine spontan reversible und esteraseunabhängige Hemmung der Leitfähigkeit des peripheren Nerven beschrieben. Sicher würde ein solcher Effekt unsere Interpretation in Frage stellen. Die Tatsache, daß Cardiazol die Phrenicus-Impulse nach ihrem völligen Verschwinden erneut erscheinen läßt, spricht jedoch für eine zentralnervöse Lokalisation der durch Paraoxon ausgelösten Atemlähmung; eine Lähmung des peripheren Nerven dürfte durch Cardiazol kaum zu beeinflussen sein. Wir zweifeln jedoch nicht daran, daß die durch TEPP zu erzielende Lähmung der nervösen Leitfähigkeit (Murtha u. Mitarb. 1955) und die durch Paraoxon zu erzielenden zentralnervöse Lähmung der Atemfunktion (siehe oben) auf einem ähnlichen Wirkungsmechanismus beruhen: beide Effekte sind unabhängig von der durch diese Alkylphosphate bewirkten Esterasehemmung, beide Effekte sind reversibel.

Der reversibel lähmende Effekt von Paraoxon auf das zentrale (und periphere) Nervensystem legt den Gedanken nahe, daß es sich hierbei um eine unspezifische lähmende Wirkung handelt. Der Erfolg des Analepticum Cardiazol bei der zentralen Atemlähmung nach Paraoxon scheint diese Annahme zu bestätigen.

Diese Folgerung steht im Widerspruch zu den Befunden von Douglas u. Matthews (1952), die einen durch 0,45 mg/kg TEPP i.v. ausgelösten Atemstillstand mit Atropin aufzuheben vermochten. Da in diesem Falle (Dosis!) die neuromuskuläre Erregungsübertragung noch intakt war (Fig. 10 dieser Arbeit), könnte es sich vielleicht um eine zentrale „Atemhemmung" und nicht um eine echte Atemlähmung gehandelt haben: Erfahrungsgemäß tritt die neuromuskuläre Lähmung zeitlich *vor* der zentralen Atemlähmung auf (vgl. auch Fig. 7 dieser Arbeit). Eine zentrale Atemhemmung wäre denkbar etwa als Folge eines Anstieges von freiem Acetylcholin im Blut. In unseren Versuchen am PAM-geschützten Tier kam es sicher nicht zu einem nennenswerten Acetylcholin-Spiegel im Blut, da die Cholinesterase — abgesehen von der des ZNS — ja aktiv, d. h. „reaktiviert" ist. Es muß ferner berücksichtigt werden, daß in unseren oscillographischen Versuchen die Atropinisierung zu den Versuchsbedingungen gehörte. Die erzielte zentrale Atemlähmung wird somit kaum als cholinerger Natur anzusehen sein.

An Mäusen, die mit Atropin (50 mg/kg) und PAM (25 mg/kg) vorbehandelt waren, konnte Hobbiger (1957) die LD 50 von Paraoxon durch zusätzliche Behandlung mit Cardiazol (60 mg/kg) nicht signifikant erhöhen. Es erscheint demnach fraglich, ob analeptischen Substanzen bei der medikamentösen Behandlung von Alkylphosphatvergiftungen eine praktische Bedeutung zukommt, wenn nicht gleichzeitig für eine ausreichende künstliche Beatmung Sorge getragen wird.

Summary

Intoxication by parathion or paraoxon paralyses the respiration of the anesthetized or the decerebrated cat or rat (even if atropine is given for protection). The paralysis of respiration is caused manly by blocking

the neuromuscular transmission, and is reversed by the spezific enzyme reactivating antidote pyridine-2-aldoxime methiodide (PAM). A higher dose of the alkylphosphate paraoxon paralyses the central control of respiration (the action potentials of the phrenic nerve disappear during the artificial ventilation of the animal). The paralysis of the central control of respiration is reversed by an unspezific analeptic drug (metrazol), but not by PAM.

Literatur

Bethe, K., W. D. Erdmann, L. Lendle u. G. Schmidt: Spezifische Antidotbehandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 3 (1957).

DeCandole, C. A., W. W. Douglas, C. L. Evans, R. Holmes, K. E. V. Spencer, R. W. Torrance and K. M. Wilson: The failure of respiration in death by anticholinesterase poisoning. Brit. J. Pharmacol. **8**, 466 (1953).

Davison, A. N.: The conversion of schradan (OMPA) and parathion into inhibitors of cholinesterase by mammalian liver. Biochem. J. **61**, 203 (1955).

Diggle, W. M., and J. C. Gage: Cholinesterase inhibition by parathion in vivo. Nature (Lond.) **168**, 998 (1951).

Dirnhuber, P., and H. Cullumbine: The effect of anticholinesterase agents on the rat's blood pressure. Brit. J. Pharmacol. **10**, 12 (1955).

Douglas, W. W., and P. B. C. Matthews: Acute tetraethylpyrophosphate poisoning in cats and its modification by atropine or hyoscine. J. Physiol. (Lond.) **116**, 202 (1952).

Erdmann, W. D., H. D. Kempe u. W. Lühning: Über die Wirkung von Esteraseblockern (E 605, Eserin und Prostigmin) auf das Atemzentrum von Katze und Hund. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **225**, 359 (1955).

Erdmann, W. D.: Versuche zur Deutung des sogenannten „Vulpian-Effektes" von Curarin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 272 (1956).

Erdmann, W. D., u. D. Heye: Analyse der erregenden und lähmenden Wirkung von Alkylphosphaten (Parathion, Paraoxon, Systox) am isolierten Kaninchendarm. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 507 (1957).

Erdmann, W. D., u. L. Lendle: Vergiftungen mit esteraseblockierenden Insecticiden aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester (E 605 und Verwandte). Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **1958** (im Druck).

Frawley, J. P., E. C. Hagan and O. G. Fitzhugh: A comparative pharmacological and toxicological study of organic phosphate-anticholinesterase compounds. J. Pharmacol. exp. Ther. **105**, 156 (1952).

Friedberg, K. D., u. F. Sakai: Spezifischer Nachweis von Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Gewebe bei Vergiftungen mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid = PAM). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 232 (1957), Tggs.bericht. — Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **1958** (im Druck).

Hiraki, K., and T. Namba: Causal therapy of alkylphosphate poisoning. Nippon Igakukai Zasshi **37**, 691 (1957). Acta Med. Okayama **11**, 31 (1957).

Hobbiger, F.: Protection against the lethal effects of organophosphates by pyridine-2-aldoxime methiodide. Brit. J. Pharmacol. **12**, 438 (1957).

Holmstedt, B.: Synthesis and pharmacology of dimethylamidoethoxyphosphoryl cyanide (tabun) together with a description of some allied anticholinesterase compounds containing the N-P-bond. Acta physiol. scand. (Stockh.) **25**, Suppl. 90 (1951).

Hornykiewicz, O., u. W. Kobinger: Über den Einfluß von Eserin, Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) und Neostigmin auf den Blutdruck und die pressorischen Carotissinusreflexe der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 493 (1956).

Kewitz, H., and D. Nachmansohn: A specific antidote against lethal alkylphosphate intoxication. IV. Effects in brain. Arch. Biochem. **66**, 271 (1957).

Kewitz, H.: Die Wiederherstellung der Cholinesteraseaktivität bei der Alkylphosphat-Vergiftung durch ein spezifisches Antidot. Klin. Wschr. **1957**, 521.

Koelle, G. B.: Histochemical demonstration of reactivation of acetylcholinesterase in vivo. Science (Lancaster, Pa.) **125**, 1195 (1957).

Kubistova, J.: Parathion metabolism in rat liver and kidney slices. Experientia (Basel) **12**, 233 (1956).

Murtha, E. F., B. P. McNamara, L. J. Edberg, A. D. Bergner and J. H. Wills: Studies on the pharmacology of tetraethylpyrophosphate. J. Pharmacol. exp. Ther. **115**, 291 (1955).

Paulet, G.: Activité cholinestérasique et fonctionnement des centres respiratoires. J. de Physiol. **48**, 915 (1956).

Salerno, P. R., and J. M. Coon: A pharmacologic comparison of hexaethyltetraphosphate (HETP) and tetraethylpyrophosphate (TEPP) with physostigmine, neostigmine and DFP. J. Pharmacol. exp. Ther. **95**, 240 (1949).

Schaumann, W., and C. Job: Effects of cholinesterase inhibitors on the central control of respiration and on neuromuscular transmission. Their antagonism against the respiratory arrest caused by morphine. J. Pharmacol. exp. Ther. **1958** (im Druck).

Vulpian, H.: Leçons sur les substances toxiques. Paris 1882; zitiert nach Lapicque, L., et M.: C. R. Soc. Biol. (Paris) **141**, 468 (1947).

Wills, J. H., A. M. Kunkel, R. V. Brown and G. E. Groblewsky: Pyridine-2-aldoxime methiodide and poisoning by anticholinesterases. Sciences (Lancaster, Pa.) **125**, 743 (1957).

Dr. H. dal Ri, Pharmakologisches Institut der Universität Göttingen, Geiststr. 9

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 220—232 (1958)

Aus der Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses
Stuttgart-Bad Cannstatt (Direktor: Prof. Dr. G. Schettler)

Untersuchungen über den Einfluß pharmakologischer Substanzen auf den tubulären Transport von p-Aminohippursäure*

Von

Dieter P. Mertz

(Eingegangen am 6. Mai 1958)

In den vergangenen Jahren beschäftigten sich namentlich Taggart et al.[9,10,17,32,33,38,41,42] mit der Aufklärung der biochemischen Eigenschaften renal tubulärer Transportmechanismen. Sie prüften die Transportbedingungen von Substanzen, die zur quantitativen Bestimmung des gesamten tubulären exkretorischen Gewebes geeignet sind (Phenolrot, Diodrast, p-Aminohippursäure = PAH, Penicillin). Dabei wurde dem tubulären Exkretionsmechanismus von PAH besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Nach Taggart[41] nimmt Acetat als einer der wichtigsten Faktoren, die den PAH-Transport quantitativ begrenzen, eine Schlüsselstellung in diesem Transportsystem ein. Der stimulierende Effekt von Acetat auf den PAH-Transport ist als weitgehend spezifisch, die schwächere Wirkung von Milchsäure und Brenztraubensäure im Sinne einer Präcursorenfunktion von Acetat aufzufassen. Andere oxydable Metabolite, die gleichfalls die Zellatmung anregen, beeinflussen den tubulären PAH-Transport anders als diese Substanzen: Tricarbonsäuren sind wirkungslos, während Dicarbonsäuren (α-Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Malonsäure), Glykokoll, Alanin, Glutaminsäure und Fettsäuren mit 6—12 C-Atomen den Transport sogar hemmen. Phosphorylierte intermediäre Stoffwechselprodukte der anaeroben Glykolyse zeigen keine Wirkung auf Zellatmung und PAH-Transport.

Unter den zahlreichen natürlichen und synthetischen Substanzen, die den PAH-Transport zu hemmen vermögen, finden sich einmal solche, die die Zellatmung durch direkten Angriff an einem oder mehreren oxydativen Enzymen des Citronensäurecyclus oder am Cytochromsystem herabsetzen. Zum anderen üben aktive Nitrophenole (z. B. 2,4-Dinitrophenol = DNP) und andere Stoffe, die die aerobe Bildung

* Herrn Prof. Dr. Dr. H. Schriever zum 60. Geburtstag.

energiereicher Phosphate beeinflussen, eine nicht ganz unspezifische Hemmwirkung auf den PAH-Transport aus, da diese Substanzen in der üblichen Dosierung beispielsweise die tubuläre Reabsorption von Glucose, Natrium, Kalium oder Orthophosphat nicht verändern. Eine weitere Gruppe von Substanzen, die über denselben Mechanismus tubulär ausgeschieden werden, hemmt den PAH-Transport kompetitiv (Diodrast, Penicillin, Phenolrot). Schließlich bilden Carinamid und Benemid, die selbst nicht aktiv tubulär zur Ausscheidung gelangen, aber die tubuläre Ausscheidung von PAH, Diodrast, Penicillin und Phenolrot drosseln (Beyer[1]), eine eigene Gruppe. Beyer et al.[2] konnten zeigen, daß Benemid die Hippuratsynthese in der Niere hemmt.

Da mit Ausnahme von Phenolrot sämtliche PAH-Hemmstoffe Carboxylgruppen tragen, glaubte Taggart[41], daß die Carboxylgruppe mit einem bestimmten cellulären Element des Transportmechanismus in Reaktion trete. Die Sonderstellung von Acetat im PAH-Transportmechanismus und die Ansicht, daß Benemid durch Blockierung der Synthese von Benzoyl-Coenzym A wirksam ist, veranlaßte Taggart[41] zu der Annahme, daß Coenzym A (CoA) im tubulären Ausscheidungsmechanismus von PAH eine bedeutende Rolle spielt. Nach dieser Vorstellung ist Acetat in katalytischen Mengen direkt in die intermediären Austauschvorgänge beim PAH-Transport einbezogen. Unter Aufsplitterung von ATP nimmt Acetat an einer obligatorischen Austauschreaktion teil, die den Abbau von hypothetischem intermediärem p-Aminohippuryl-CoA erleichtern soll. Für diese Möglichkeit spricht der Befund von Wiebelhaus et al.[47], wonach die maximale tubuläre Exkretionskapazität von PAH(Tm_{PAH}) bei Hunden, denen Acetat und Pantothensäure als Bestandteil von CoA gleichzeitig infundiert wurden, mehr anstieg als nach Acetatgaben allein.

Ein über CoA laufender tubulärer PAH-Transport würde nur einen sehr geringen freien Energiewechsel erfordern. Dementsprechend stellten Clark u. Barker[7] fest, daß sich Glomerulusfiltration, Nierenplasmastrom und Sauerstoffverbrauch der Niere bei Tubulussättigung mit PAH ebenso wenig ändern wie bei Belastung der Niere mit Wasser oder Mannit. Auch Graham et al.[22] konnten für den aktiven PAH-Transport nur einen geringen Sauerstoffbedarf nachweisen.

Da trotz dieser Befunde unsere Kenntnisse über die renalen Transportmechanismen und deren Beeinflussung durch therapeutisch oder diagnostisch häufig angewendete Mittel noch lückenhaft sind, prüften wir an gesunden und einigen kranken Erwachsenen die Wirkung von l-Cystein, Histamin, L-3,5,3′-Trijodthyronin, Prednisolon und Cortexon auf das tubuläre Maximum von PAH(Tm_{PAH}). Nach unserem Wissen sind die genannten Substanzen in dieser Beziehung am Menschen bis jetzt nicht oder nur im Tierversuch erprobt worden.

Versuchsverfahren

Bei 31 Versuchspersonen (20 Männern und 11 Frauen) im Alter von 17—56 Jahren wurden tubuläres Maximum von PAH (Tm_{PAH}) unter Heranziehung der Inulin-Clearance (C_{In}) als Maß für die Glomerulusfiltration und zum Teil renale Ausscheidung von Na, K, Ca, Mg, P und Cl (spektrochemisch mit Quarzspektrograph 110 M, Fuess) vor und nach Gabe von l-Cystein, Histamin, L-3,5,3′-Trijodthyronin, Prednisolon und Cortexon bestimmt. In Gruppe 1a erfaßten wir 4 Personen (2 Normalpersonen ohne Störungen von Herz-, Leber-, Nieren- und Kreislauffunktion bzw. von Wasserhaushalt, Mineralstoffwechsel oder Endokrinium und je 1 Patient mit Nephrose und Urämie als Folge einer chronischen Nephritis), an denen die Wirkung einer i.v.-Gabe von 0,1 g l-Cystein geprüft wurde. 6 Normalpersonen und 1 Patientin mit abklingender Schwangerschaftsnephropathie, die als Gruppe 1b aufgeführt sind, erhielten 0,3 g l-Cystein i.v. Je 0,5 mg Histamin s.c. wurde 4 Normalpersonen in Gruppe 2 gegeben. Gruppe 3 setzte sich aus 3 Normalpersonen und 1 Patienten mit Morbus Cushing zusammen. Als Testmittel bekam jede Person in dieser Gruppe eine perorale Tagesdosis von 0,1 mg L-3,5,3′-Trijodthyronin an 2 aufeinander folgenden Tagen (a). Bei denselben Versuchspersonen wurde unter der Trijodthyroninwirkung der Effekt einer zusätzlichen i.v.-Applikation von 0,3 g l-Cystein geprüft (b). Bei 7 Versuchspersonen von Gruppe 4 (5 Normalpersonen, 2 Patienten mit chronischer Nephritis) verwendeten wir als Testsubstanz 25 mg wasserlösliches Prednisolon i.v., bei 5 Versuchspersonen von Gruppe 5 (3 Normalpersonen, je 1 Patient mit essentieller Hypertonie bzw. subchronischer Nephritis) 10 bzw. 20 mg wasserlösliches Cortexon i.v.

Tm_{PAH} wird aus der Differenz zwischen der innerhalb 1 min im Urin ausgeschiedenen und gleichzeitig glomerulär filtrierten PAH-Menge nach der Formel $Tm_{PAH} = U_{PAH} \cdot V - C_{In} \cdot P_{PAH}$ errechnet, wobei U, P_{PAH} die Urin- bzw. Plasmakonzentration von PAH, C_{In} die Inulinclearance und V die Urinmenge/min darstellen. Die zur Messung von Tm_{PAH} erforderliche Absättigung der renalen Tubuli mit PAH ist bei Plasmakonzentrationen von 20 mg-% sicher erreicht. Die Normalwerte von Tm_{PAH} liegen nach H. W. Smith[40] bei Personen bis zum 40. Lebensjahr um 75 ± 15 mg/min/1,73 m² Körperoberfläche. Mit zunehmendem Alter erfolgt ein nahezu linearer Abfall, so daß um das 80. Lebensjahr nur noch etwa 56% des Normalwertes als physiologisch anzusehen sind (Davies u. Shock[12]).

Bei sehr hohen Plasmaspiegeln, die ein Verhältnis zwischen tubulärem PAH-Angebot und Tm_{PAH} von über 8 aufweisen, tritt eine sog. Selbsthemmung von Tm_{PAH} auf (H. W. Smith[40]). Diese beruht auf einer Hemmung des tubulären Transportsystems, ist bei Absinken des Plasmaspiegels spontan reversibel und kann durch i.v.-Gabe von Acetat aufgehoben werden (Schachter u. Freinkel[37]). Zur Erzielung brauchbarer PAH-Konzentrationen im Plasma ließen wir uns von der Tatsache leiten, daß sich bei Einstellung eines Fließgleichgewichtes einer renalen Clearancesubstanz deren i.v.-Zufuhr und renale Exkretion entsprechen müssen (Eppler, Harth, Kreienberg u. Mertz[15]). Demzufolge infundierten wir in der Zeiteinheit nur so viel PAH, wie bei einem Plasmaspiegel von 20 mg-% maximal ausgeschieden werden kann, d. h. normalerweise 110 bis 130 mg/min (80—90 mg tubulär, 20—30 mg glomerulär bei einer C_{In} von 100—150 ml/min). Bei Nierenkranken und älteren Personen gaben wir entsprechend weniger. Auf diese Weise arbeiteten wir in anhezu allen Fällen im sehr wirtschaftlichen Konzentrationsbereich zwischen 20 und 30 mg-%.

Wie in früheren Untersuchungen waren die Versuchspersonen nüchtern und nahmen über die Versuchsdauer eine bequeme Rückenlage ein. 90 min vor Versuchsbeginn ließen wir zwischen 6 und 10 ml Flüssigkeit/kg Körpergewicht trinken, um eine gute und einigermaßen konstante Diurese zu erzielen. Sämtliche gesunden

Versuchspersonen standen an den Vortagen unter gleichen diätetischen Bedingungen und befanden sich im Flüssigkeitsgleichgewicht. Die jeweils 30 min dauernden Clearanceperioden begannen erst nach Erreichen eines Verteilungsgleichgewichtes von PAH und Inulin mit einer 2-Stufen-Infusion (Mertz[29,30]), d. h. frühestens nach 60 min. In jedem Falle wurden 2—3 Vorperioden und dann bei Gruppe 1, 2, 4 und 5 2—3 weitere Versuchsperioden durchgeführt, nachdem das entsprechende Testmittel vorher appliziert worden war. Bei Gruppe 3 mußte der Versuch nach 2tägiger Gabe von Trijodthyronin wiederholt werden, da dieses Mittel erst dann voll zur Wirkung kommt (Blackburn et al[4,27]). Die unter der Wirkung der Testsubstanzen erhaltenen Meßwerte wurden zum arithmetischen Mittel der in den Vorperioden erzielten Ergebnisse in Beziehung gesetzt.st

Mit der Infusion wurden bei Gesunden in den ersten 20 min etwa 650 mg PAH und 150 mg Inulin/min und dann etwa 125 mg PAH und 30 mg Inulin/min gegeben. Die mit der Infusion verabfolgte Flüssigkeitsmenge betrug etwa 1 ml/min. Den Urin gewannen wir durch Dauerkatheter aus der Harnblase, die am Ende jeder Versuchsperiode mit 50 ml Aqua dest. gespült wurde. Gleichzeitig mit dem Urin wurden Blutproben aus der V. cubitalis des gegenüberliegenden Armes abgenommen. Inulin bestimmten wir nach Roe, Epstein u. Goldstein[36], PAH nach Czok, Kreienberg u. Mertz[11].

Die statistische Beurteilung der Meßreihen erfolgte nach Helmert, Student und Fisher. Um die Besonderheiten jeder Versuchsperson zu berücksichtigen, wurde der statistischen Auswertung jeder Meßreihe zweckmäßig die Differenz der einzelnen Untersuchungswerte vor und nach Gabe der Testsubstanz zugrunde gelegt. Dabei wurde geprüft, ob der Mittelwert der Differenzen (M) sicher von Null verschieden ist. Da die Anzahl der Freiheitsgrade m in jedem Falle kleiner als 60 ist, gehorcht die Verteilung der Mittelwerte der Abweichung t, die den Quotient aus dem Mittelwert der Differenzen M und dem mittleren Fehler des Mittelwertes σ_M darstellt. Die quadratische Streuung der Mittelwerte wurde mit σ_X^2 bezeichnet.

Ergebnisse

Die Nierenfunktion wird durch i.v. Applikation von 0,1 und 0,3 g l-Cystein jeweils nur in der auf die Injektion folgenden Clearanceperiode, also höchstens 30 min lang, beeinflußt. Danach stellen sich die Ausgangswerte wieder ein. In einer Dosierung von 0,1 bewirkt l-Cystein eine Steigerung von Tm_{PAH} um durchschnittlich 25,1 (Spanne: + 9,2 bis + 64,8) % (vgl. Tab. 1a). Wie Tab. 6 angibt, läßt sich dafür eine Signifikanz mit $P < 0{,}05$ nachweisen. Inulinclearance, Urinmenge und renale Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid bleiben unverändert. Die Exkretion von Phosphor ist in allen Fällen vermehrt, während die Ausscheidung von Calcium und Magnesium entsprechend den von uns (Mertz[30]) früher für diese Ionen gefundenen Gesetzmäßigkeiten ein paralleles Verhalten zu Änderungen des Harnflusses aufweist. Demgegenüber übt eine i.v. Injektion von 0,3 g l-Cystein ausnahmslos eine hemmende Wirkung auf Tm_{PAH} aus. Nach den in Tab. 1b aufgeführten Werten beträgt die Verminderung durchschnittlich 25,7 (Spanne: — 11,1 bis — 38,4)%; sie ist mit $P < 0{,}0027$ hochsignifikant (Tab. 6). Ein Einfluß auf Inulinclearance, Urinmenge und renale Ausscheidung von Natrium, Chlorid und Phosphor ist nicht erkennbar.

Tabelle 1a. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung von 0,1 g l-Cystein i.v.*

	Tm_{PAH}			C_{In}			U			A_{Na}	A_K	A_{CA}	A_{Mg}	A_P	A_{Cl}
	V	W	N	V	W	N	V	W	N						
Normalperson, 24 J., w.	64,9	70,9	68,3	108	104	107	1,833	1,667	1,833	+ 7,6	± 0	— 14,4	— 20,0	+ 46,1	+ 3,4
Normalperson, 22 J., m.	72,3	84,6	73,0	119	128	120	2,000	2,137	1,900	+ 4,5	— 2,1	+ 9,9	+ 5,3	+ 16,2	— 1,5
Nephrose (behandelt m. Prednison), 18, w.	59,9	65,4	59,5	153	141	132	3,300	2,830	2,500	+ 5,6	— 9,1	— 31,5	— 12,9	+ 14,3	+ 4,7
Urämie, 36 J., w.	8,8	14,5	9,2	33	42	27	1,667	5,000	1,833	— 22,0	— 32,4	+ 30,2	+ 33,7	+ 33,8	— 30,0

Tabelle 1b. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung von 0,3 g l-Cystein i.v.*

	Tm_{PAH}			C_{In}			U			A_{Na}	A_K	A_{CA}	A_{Mg}	A_P	A_{Cl}
	V	W	N	V	W	N	V	W	N						
Normalperson, 21 J., m.	89,2	54,9	82,7	113	139	134	3,300	2,667	2,500	— 21,4	+ 24,5	— 37,5	— 42,0	— 7,4	— 38,7
Normalperson, 27 J., m.	78,9	62,0	80,1	121	127	103	2,130	1,667	1,836	+ 18,8	+ 12,3	— 14,8	— 22,0	+ 2,0	+ 11,6
Normalperson, 40 J., m.	69,1	45,3	78,8	111	104	105	2,300	3,000	2,500	— 5,1	+ 40,6	+ 24,0	+ 27,3	— 10,0	± 0
Normalperson, 25 J., m.	74,4	66,1	79,3	137	130	119	3,333	4,830	3,160	— 7,7	+ 12,4	— 17,5	+ 13,8	— 29,3	+ 1,7
Normalperson, 20 J., m.	70,6	61,1	63,1	130	138	127	2,500	1,835	1,835	+ 11,8	± 0	— 34,4	— 28,1	— 46,3	+ 12,5
Normalperson, 36 J., w.	68,3	50,7	63,3	146	145	157	3,333	2,500	3,167	— 5,1	— 6,8	— 25,0	— 20,0	+ 78,8	+ 12,3
Z. n. Schwangerschafts-nephropathie, 33 J., w.	59,3	39,0	68,3	122	109	119	2,833	2,000	2,667	— 8,5	+ 14,3	— 29,7	— 26,6	+ 6,7	+ 42,5

Zeichenerklärung: Tm_{PAH} = tubuläres Maximum von PAH in mg/min/1,73 m²; C_{In} = Inulinclearance in ml/min/1,73 m²; U = Urinmenge in ml/min; $A_{Na, K\ etc.}$ = renale Ausscheidung von Na, K etc. in Prozent zum Wert der Vorperiode; V, W, N = vor, während bzw. nach Wirkung des Testmittels; m = Mann; w = Frau.

Kalium wird in den meisten Fällen vermehrt, Calcium und Magnesium wiederum parallel zu Änderungen des Harnvolumens vermehrt oder vermindert ausgeschieden.

Einmalige s.c. Gabe von 0,5 mg Histamin bewirkt für die Dauer der auf die Injektion folgenden Clearanceperiode Herabsetzung von Tm_{PAH} um durchschnittlich 36,9 (Spanne: —27,9 bis —44,1)%, der Inulinclearance um durchschnittlich 27,3 (Spanne: —20,3 bis —33,9)%

Tabelle 2. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung von 0,5 mg Histamin s.c.*

	Tm_{PAH} (mg/min/1,73 m²)			C_{In} (ml/min/1,73 m²)			U (ml/min)		
	V	W	N	N	V	W	V	W	N
Normalpers. 17 J., w.	88,1	55,6	89,9	158	123	153	3,333	1,833	3,000
Normalpers. 18 J., w.	69,4	38,2	71,8	110	74	130	4,330	2,660	4,830
Normalpers. 37 J., m.	72,5	44,3	69,1	115	76	129	3,200	1,167	2,900
Normalpers. 29 J., w.	70,8	51,1	74,7	103	81	107	1,833	0,900	1,750

Tabelle 3a. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung einer peroralen Gabe von je 0,1 mg L-3,5,3′Trijodthyronin an 2 aufeinander folgenden Tagen*

	Tm_{PAH} (mg/min/1,73 m²)		C_{In} (ml/min/1,73 m²)		U (ml/min)	
	V	W	V	W	V	W
Normalperson, 25 J., m.	74,4	85,6	137	160	3,333	3,750
Normalperson, 20 J., m.	70,6	79,7	130	123	2,500	2,800
Normalperson, 36 J., w. .	68,3	80,0	146	164	3,333	3,600
M. Cushing, 28 J., m. . .	72,5	82,7	134	147	2,000	2,400

und der von Urinmenge um durchschnittlich 49,6 (Spanne: —38,5 bis —63,6)% (vgl. Tab. 2). Für sämtliche 3 Meßreihen ergeben sich laut Tab. 6 Signifikanzen mit $P < 0{,}0027$ bzw. $< 0{,}01$.

Tab. 3a zeigt die durch eine 2 Tage lange perorale Medikation von täglich 0,1 mg L-3,5,3′-Trijodthyronin hervorgerufenen Änderungen der Nierenfunktion. Während sich eine Steigerung von Tm_{PAH} um durchschnittlich 14,6 (Spanne: +11,1 bis +17,1)% und von der Urinmenge um durchschnittlich 13,1 (Spanne: +8,0 bis +20,0)% statistisch mit $P < 0{,}001$ bzw. $< 0{,}01$ (vgl. Tab. 6) sichern läßt, ist die Zunahme der Inulinclearance um durchschnittlich 8,4 (Spanne: — 5,4 bis + 16,8)% nicht signifikant ($P > 0{,}05$). Der durch Trijodthyronin ausgelöste Effekt ist in allen Clearanceperioden nachweisbar, da die in der Klinik beobachtete Wirkungsdauer des Mittels etwa 24 Std beträgt (Frawley et al.[18]). Wir setzten daher in Tab. 3a das arithmetische Mittel der jeweils in 2—3 Clearanceperioden festgestellten Meßwerte ein. Der oben beschriebene Hemmeffekt von 0,3 g l-Cystein auf Tm_{PAH} ist bei den unter Trijodthyroninwirkung stehenden Versuchspersonen aufgehoben (vgl. Tab. 3b). Für eine Förderung von Tm_{PAH} um durchschnittlich

18,3% läßt sich infolge der weiten Spanne von + 2,5 bis + 39,4% und der damit zusammenhängenden erheblichen Streuung (vgl. Tab. 6) keine statistisch Sicherung erbringen ($P > 0{,}05$). Die Wirkung einer zusätzlichen Gabe von 0,3 g l-Cystein ist mit Ausnahme eines Falles

Tabelle 3b. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung einer peroralen Gabe von je 0,1 mg L-3,5,3′Trijodthyronin an 2 aufeinanderfolgenden Tagen und einer i.v. Applikation von 0,3 g l-Cystein*

	Tm_{PAH} (mg/min/1,73m²)			C_{In} (ml/min/1,73 m²)			U (ml/min)		
	V	W	N	V	W	N	V	W	N
Normalpers. 25 J., m.	85,6	101,8	102,4	160	178	156	3,750	2,670	2,330
Normalpers. 20 J., m.	79,7	111,1	89,3	123	162	127	2,800	2,830	1,630
Normalpers. 36 J., w.	80,0	82,0	79,3	164	134	133	3,600	2,333	2,833
M. Cushing, 28 J., m.	82,7	92,6	84,5	147	156	140	2,400	2,100	2,100

Tabelle 4. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung von 25 mg Prednisolon i.v.*

	Tm_{PAH} (mg/min/1,73 m²)		C_{II} (ml/min/1,73 m²)		U (ml/min)	
	V	W	V	W	V	W
Normalperson, 45 J., m.	61,7	64,3	108	125	2,500	2,333
Normalperson, 50 J., w. .	55.1	55,3	102	105	1,000	1,000
Normalperson, 51 J., m.	53,2	57,2	119	108	2,000	2,167
Normalperson, 18 J., m.	83,4	82,2	155	160	2,500	2,667
Normalperson, 18 J., m.	74,0	70,9	143	157	2,000	2,000
Chron. Nephritis, 56 J., m.	44,3	45,0	68	72	3,667	4,167
Chron. Nephritis, 45 J., m.	27,7	60,0	51	55	1,767	1,833

Tabelle 5. *Verhalten der Nierenfunktion unter der Wirkung von 10—20 mg Cortexon*

	Tm_{PAH} (mg/min/1,73 m²)		C_{In} (ml/min/1,73 m²)		U (ml/min)	
	V	W	V	W	V	W
Normalperson, 52 J., m. . .	57,4	56,5	105	117	2,100	2,500
Normalperson, 56 J., w. . . .	48,3	51,7	115	115	2,833	3,000
Normalperson, 32 J., m. . . .	81,2	82,1	125	123	3,344	2,667
Essentielle Hypertonie, 42 J., m.	47,1	52,4	117	108	2,170	2,333
Chron. Nephritis, 44 J., m.. .	4,4	6,5	34	36	2,400	2,750

(1 Std) nach 30 min abgeklungen. Inulinclearance und Harnfluß zeigen keine deutliche Änderung.

Durch i.v. Injektion von 25 mg Prednisolon bzw. 10—20 mg Cortexon wird Tm_{PAH} bei Normalpersonen nicht beeinflußt (vgl. Tab. 4 u. 5) Eine Steigerung von Tm_{PAH} ist lediglich bei 2 Patienten mit chronischer Nephritis festzustellen. Einmal ruft Prednisolon eine Zunahme um 116,2%, zum anderen Cortexon eine solche um 47,7% hervor. Es kann nicht entschieden werden, ob es sich dabei um einen Zufallsbefund handelt.

Tabelle 6. *Schema zur statistischen Beurteilung der Meßreihen in Tabelle 1—5*

Änderung von Sm_{PAH} nach Gabe von	M	σ_x^2	σ_M	m	t	P
0,3 g l-Cystein . . .	— 17,65	72,42	± 3,22	6	5,48	< 0,0027
0,1 g l-Cystein . . .	+ 7,37	10,89	± 1,65	3	4,47	< 0,05
0,5 mg Histamin . .	— 27,90	33,33	± 2,88	3	9,69	< 0,0027
0,1 mg L-3,5,3′-Trijodthyronin . . .	+ 10,55	1,30	± 0,57	3	18,50	< 0,001
0,1 mg Trijodthyronin	+ 14,85	154,00	± 6,20	3	2,39	> 0,05
0,3 g l-Cystein 25 mg Prednison .	+ 4,99	150,58	± 4,63	6	1,08	> 0,05
10—20 mg Cortexon	+ 2,16	5,59	± 1,06	4	2,03	> 0,05
Änderung von C_{In} nach Gabe: von: Histamin (0,5 mg) .	— 32,75	62,07	± 3,92	3	8,35	< 0,01
0,1 mg L-3,5,3′-Trijodthyronin . .	+ 11,75	173,00	± 6,57	3	1,78	> 0,05
Änderung der Urinmenge nach Gabe von: 0,5 mg Histamin . .	— 1,534	0,242	± 0,246	3	6,23	< 0,01
0,1 mg L-3,5,3′-Trijodthyronin . .	+ 0,346	0,009	± 0,047	3	7,36	< 0,01

Diskussion

Unter normalen Bedingungen ist der aktive renale PAH-Transport bei jedem Menschen durch einen konstanten und gut reproduzierbaren maximalen Wert (Tm_{PAH}) begrenzt (H. W. Smith et al.[6]). Da den aktiven Transportmechanismen jedoch chemische Prozesse zugrunde liegen, ist es verständlich, daß diätetische Einflüsse und Körpertemperatur die spezifischen renalen Funktionen bereits bei Gesunden verändern können. So beobachtet man eine Zunahme von Tm_{PAH} sowohl nach Zufuhr eiweißreicher Kost (Pullman et al.[34]) und hoher Dosen von Vitamin A (Corcoran u. Page[8]) als auch bei Erhöhung der Körpertemperatur (Smith[40]), während Verschiebungen von p_H-Wert und Bicarbonatgehalt des Plasmas keine deutlichen Änderungen von Tm_{PAH} hervorrufen (McDonald et al.[28]). Diese Gesichtspunkte wurden bei der Auswahl und Vorbereitung unserer Versuchspersonen berücksichtigt. Dementsprechend zeichnen sich die in Tab. 1—5 wiedergegebenen Tm_{PAH}-Werte bei jeder Versuchsperson durch eine weitgehende Konstanz und Reproduzierbarkeit aus. Die Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den von H. W. Smith[40] bei jüngeren Personen ermittelten Normalwerten und bestätigen den Befund von Davies u.

Shock[12], wonach die maximale Leistungsfähigkeit des tubulären PAH-Transportsystems altersabhängig ist.

Über Untersuchungen, die die Prüfung des Einflusses von l-Cystein, Histamin, L-3,5,3′-Trijodthyronin und Prednisolon auf Tm_{PAH} zum Gegenstand haben, ist uns bisher nichts bekannt geworden. Die Versuche mit l-Cystein ergaben in einer therapeutischen Dosierung von 0,1 g i.v. eine fördernde, in einer Überdosierung von 0,3 g eine hemmende Wirkung auf Tm_{PAH}. Als Redoxsubstanz gehört l-Cystein zu denjenigen Thiolkörpern, die außer der Funktion eines Stoffwechselaktivators eine Strahlenschutzwirkung entfalten. Wir glauben, daß als Angriffspunkt von l-Cystein in unseren Versuchen das für den PAH-Transport wichtige CoA in Frage kommt, da die Wirksamkeit von CoA an eine Thiolgruppe gebunden ist. Unter dieser Betrachtungsweise könnte der Anstieg von Tm_{PAH} nach i.v. Applikation von 0,1 g l-Cystein durch eine Aktivierung dieses Enzyms erklärt werden. Schwieriger ist die Deutung der Hemmwirkung des Mittels bei Überdosierung mit 0,3 g. Indessen kann man unter Heranziehung der Hypothese von Eldjarn u. Pihl[14] annehmen, daß nach der genannten Dosierung das Gleichgewicht zwischen freien und blockierten körpereigenen Thiolgruppen so stark zugunsten einer Blockierung verschoben ist, daß eine Störung des PAH-Transportes eintritt. Dabei ist an folgende Reaktion zu denken:

$$\text{Protein} - \text{S} - \text{S} - (\text{CH}_2)_n - \text{N}\begin{matrix}\diagup \text{R}_1 \\ \diagdown \text{R}_2\end{matrix} +$$

$$+ 2\,\text{H} \rightleftarrows \text{Protein} - \text{SH} + \text{HS} - (\text{CH}_2)_n - \text{N}\begin{matrix}\diagup \text{R}_1 \\ \diagdown \text{R}_2\end{matrix}.$$

Eine Aufhebung der Blockierung ist erst dann möglich, wenn ein Teil der freien Thiolkörper in den Stoffwechsel einbezogen ist; denn diese Gleichgewichtsreaktion gehorcht dem Massenwirkungsgesetz. Ob sich an die Beseitigung einer derartigen Blockierung eine kurz dauernde Phase der Aktivierung von CoA mit reaktivem Anstieg von Tm_{PAH} auf supernormale Werte anschließt, können wir nicht entscheiden. Unsere Clearanceperioden mußten sich nämlich wegen der Genauigkeit der Urinanalysen auf eine Dauer von 30 min erstrecken.

Histamin, das hauptsächlich auf Blutgefäße, Organe mit glatter Muskulatur und verschiedene Drüsen einwirkt, rief einen statistisch gesicherten Abfall von Tm_{PAH}, C_{In} und Harnfluß hervor. In erster Linie dürften hierfür die gleichzeitig aufgetretenen hämodynamischen Veränderungen verantwortlich sein, da Histamin durch Dilatation der Capillaren im Splanchnicusgebiet und peripheren Körperbereich sowie Erhöhung der Capillarpermeabilität mit Transsudation und Verminderung der zirkulierenden Blutmenge ein Absinken des mittleren

arteriellen Blutdrucks bewirkt. Bei einer unserer Versuchspersonen fiel der mittlere arterielle Druck sogar um 37,5 auf 72,5 mm Hg ab. Unsere Anschauung wird durch die Tatsache, daß die Veränderungen der Nierenfunktion höchstens 30 min anhielten und nach Wiederherstellung der anfänglichen Blutdruckwerte niemals mehr nachweisbar waren, unterstützt. Allein mit einem Absinken des arteriellen Blutdruckes könnte nach Selkurt, Hall u. Spencer[39] eine durch Histamin ausgelöste Verminderung der Glomerulusfiltration erklärt werden, die auch Bjering[3] beschrieben hat. Wäre aber nur der Blutdruckabfall für die Nierenfunktionsänderungen maßgebend, dann müßte nach Selkurt et al.[39] die Nierendurchblutung prozentual weniger abnehmen als das Glomerulusfiltrat. Reubi u. Futcher[35] stellten jedoch fest, daß eine histaminbedingte Verminderung des Nierenplasmastroms einer Einschränkung der Glomerulusfiltratmenge vorausgeht. In Verbindung mit unserem Befund, wonach Tm_{PAH} stärker abnimmt als das Glomerulusfiltrat, muß an eine zusätzliche renale Gefäßkonstriktion gedacht werden, die bei Schockzuständen in ausgeprägtem Maße anzutreffen ist (Lauson, Bradley u. Cournand[25]). Damit würde den peripher erweiterten Gefäßgebieten mehr Blut zur Verfügung stehen. Da Histamin eine stärkere Abnahme von der Urinmenge als von Tm_{PAH} bzw. C_{In} hervorrief, besteht kein Zweifel, daß gleichzeitig eine Erhöhung der tubulären Reabsorption von Wasser stattgefunden haben mußte. Ob dafür eine histaminbedingte Anregung der ADH-Sekretion (Blackmore u. Cherry[5]) oder ein direkter Angriffspunkt von Histamin an den distalen Tubuli und Sammelröhren im Sinne einer Porenöffnung (Wirz[48]) in Betracht zu ziehen ist, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Nach unseren Ergebnissen beeinflußt das 1952 von Gross u. Pitt-Rivers[23] entdeckte L-3,5,3′-Trijodthyronin die Nierenfunktion qualitativ in ähnlicher Weise wie Thyroxin. Im allgemeinen wirkt Trijodthyronin quantitativ jedoch etwa 5mal stärker als Thyroxin (Thibault[44] Tomich et al.[45]; Gross et al.[24]). Früher fanden Eiler et al.[13], Heinbecker et al.[25] unter der Wirkung von Thyroxin eine Zunahme von $Tm_{Diodrast}$ und Glomerulusfiltration beim Hund. Wir konnten durch Trijodthyronin allerdings nur eine Steigerung von Tm_{PAH} statistisch nachweisen. Besonders auffallend ist die weitaus bessere Toleranz von 0,3 g l-Cystein bei Personen, die unter der Wirkung von Trijodthyronin stehen. Während diese Dosis bei normalen Kontrollpersonen zu einer Hemmung des tubulären PAH-Transportes ausreichte, bewirkte sie bei den Versuchspersonen der Trijodthyroningruppe eher eine leichte Förderung von Tm_{PAH}. Obwohl sich dafür (wegen der geringen Versuchszahl) keine statistische Sicherung erbringen läßt, liegt doch eine Reaktionsweise vor, die der von Personen unter der Wirkung von 0,1 g l-Cy-stein sehr ähnlich ist. Unsere Annahme, daß die Hemmwirkung von

0,3 g l-Cystein auf Tm_{PAH} bei normalen Kontrollen durch eine Blockierung der körpereigenen Thiolgruppen (in CoA) zustande kommt, wird durch diesen Befund gefestigt. Wahrscheinlich verhindert Trijodthyronin eine übermäßige Blockierung freier Thiolgruppen von CoA in den Tubuluszellen infolge einer schnelleren Einbeziehung von freiem l-Cystein in den Stoffwechsel, so daß l-Cystein in einer Dosierung von 0,3 g i.v. angedeutet sogar eine fördernde Wirkung auf das enzymatisch gesteuerte Transportgeschehen entfalten konnte.

Unter der Wirkung von Prednisolon und Cortexon zeigten normale Versuchspersonen keine deutliche Änderung der Nierenfunktion. Unsere Befunde stehen in gutem Einklang mit Angaben aus der Literatur. Nach Farah et al.[16] beeinflussen weder Adrenalektomie noch Behandlung mit ACTH, Cortison oder Cortexon die PAH-Akkumulation durch Nierenschnitte normaler oder hypophysektomierter Ratten. Friedman et al.[19] sahen bei Ratten, denen Cortexonpresslinge implantiert worden waren, erst nach mehreren Wochen eine Abnahme von Tm_{PAH}. Adrenalektomierte Ratten (Friedman et al.[20]) bzw. Hunde (Gaudino u. Levitt[22]) reagieren mit einem bemerkenswerten Abfall von Tm_{PAH}. Dagegen zeigen Addisonpatienten höchstens leicht herabgesetzte Tm-Werte (Talbott et al.[43]). Untersuchungen von Waterhouse u. Keutmann[46] zufolge bewirkt Cortexon bei diesen Patienten eine Konstanthaltung von Tm_{PAH}. Dabei beobachtete Geschlechtsunterschiede sind insofern von Interesse, als eine Abnahme von Tm_{PAH} bei Frauen häufiger festgestellt worden ist.

Die Versuche wurden mit technischer Assistenz von Frau Dr. U. Lutz-Dettinger durchgeführt.

Zusammenfassung

An 31 Versuchspersonen wird der Einfluß von l-Cystein, Histamin, L-3,5,3′-Trijodthyronin, Prednisolon und Cortexon auf die maximale tubuläre Exkretionskapazität von *p*-Aminohippursäure (Tm_{PAH}) geprüft. Dabei ergibt sich folgendes:

1. In einer Dosierung von 0,1 g bewirkt l-Cystein sofort nach i.v. Applikation für die Dauer von höchstens 30 min eine Steigerung von Tm_{PAH} um durchschnittlich 25,1% ($P < 0{,}05$). Demgegenüber wird Tm_{PAH} im Anschluß an eine i.v. Injektion von 0,3 g l-Cystein um durchschnittlich 25,7% ($P < 0{,}0027$) gehemmt. Die hemmende Wirkung ist nach spätestens 30 min abgeklungen.

2. Nach s.c. Gabe von 0,5 mg Histamin setzt parallel mit Änderungen der allgemeinen und renalen Hämodynamik eine Herabsetzung von Tm_{PAH} um durchschnittlich 36,9% ($P < 0{,}0027$), der Inulinclearance um durchschnittlich 27,3% ($P < 0{,}01$) und des Harnflusses um durchschnittlich 49,6% ($P < 0{,}01$) ein. Histamin steigert die tubuläre Reabsorption von Wasser.

3. 2 Tage lange perorale Medikation von 0,1 mg L-3,5,3′-Trijodthyronin täglich ruft eine Zunahme von Tm_{PAH} um durchschnittlich 14,6% ($P < 0{,}001$) und der Urinsekretion um durchschnittlich 13,1% ($P < 0{,}01$) hervor. Unter der Wirkung von L-3,5,3-Trijodthyronin wurde durch i.v. Injektion von 0,3 g l-Cystein keine Verminderung von Tm_{PAH} ausgelöst.

4. Durch i. v. Applikation von 25 mg Prednisolon bzw. 10—20 mg Cortexon wird Tm_{PAH} nicht beeinflußt.

5. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf Veränderungen im tubulären Zellstoffwechsel bzw. unter hämodynamischen Gesichtspunkten eingehend diskutiert.

Literatur

[1] Beyer, K. H.: J. Pharmacol. exp. Ther. **99**, 223 (1950).
[2] Beyer, K. H., V. D. Wiebelhaus, E. K. Tillson, H. F. Russo, K. M. Wilkoyte: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **74**, 772 (1950).
[3] Bjering, T.: Acta med. scand. **91**, 267 (1937).
[4] Blackburn, C. M., W. M. McConahay, F. R. Keating and A. Albert: J. clin. Endocr. **13**, 852 (1953).
[5] Blackmore, W. P., and G. R. Cherry: Amer. J. Physiol. **180**, 596 (1955).
[6] Chasis, H., J. Redish, W. Goldring, H. Ranges and H. W. Smith: J. clin. Invest. **24**, 583 (1945).
[7] Clark, J. K., and H. G. Barker: J. clin. Invest. **30**, 745 (1951).
[8] Corcoran, A. C., and I. H. Page: Fed. Proc. **6**, 91 (1947).
[9] Cross, R. J., and J. V. Taggart: Amer. J. Physiol. **161**, 181 (1950).
[10] Cross, R. J., J. V. Taggart, G. A. Covo and D. E. Green: J. biol. Chem. **177**, 665 (1949).
[11] Czok, G., W. Kreienberg u. D. P. Mertz: Klin. Wschr. **1952**, 227.
[12] Davies, D. F., and N. W. Shock: J. clin. Invest. **29**, 496 (1950).
[13] Eiler, J. J., T. L. Althausen and M. Stockholm: Amer. J.Physiol. **140**, 699 (1944).
[14] Eldjarn, L., and A. Pihl: Progr. in Radiobiol.; Proc. of the 4. int. Confer. on Radiobiology. Oliver & Boyd. London. 1956, p. 249.
[15] Eppler, F., O. Harth, W. Kreienberg u. D. P. Mertz: Z. ges. exp. Med. **126**, 450 (1955).
[16] Farah, A., F. Koda and M. Frazer: Endocrinology **58**, 399 (1956).
[17] Forster, R. P., and J. V. Taggart: J. cell. comp. Physiol. **36**, 251 (1950).
[18] Frawley, T. F., J. C. McClintock, R. T. Beebe and G. L. Marthy: J. Amer. Med. Ass. **160**, 646 (1956).
[19] Friedman, S. M., K. R. Mackenzie, and C. L. Friedman: Endocrinology **43**,
[20] 123 (1948).
Friedman, S. M., J. R. Polley and C. L. Friedman: J. exp. Med. **87**, 329 (1948).
[21] Gaudino, M., and H. F. Levitt: J. clin. Invest. **28**, 1487 (1949).
[22] Graham, G., F. Koda and A. Farah: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **84**, 226 (1953).
[23] Gross, J., and R. Pitt-Rivers: Lancet **262**, 439 (1952).
[24] Gross, J., R. Pitt-Rivers and O. Thibault: C. R. Soc. Biol. (Paris) **147**, 75 (1953).
[25] Heinbecker, P., D. Rolf and H. L. White: Amer. J. Physiol. **139**, 548 (1943).
[26] Lauson, H. D., S. E. Bradley and A. Cournand: J. clin. Invest. **23**, 381 (1944).

[27] McConahay, M. W., and C. M. Blackburn: Transact. Amer. Goiter Ass. 1954, 3—9.
[28] McDonald, K., N. W. Shock and M. F. Yiengst: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **77**, 686 (1951).
[29–31] Mertz, D. P.: Ärztl. Forsch. **11**, I/8 (1957); Klin. Wschr. **1956**, 887; Klin. Wschr. **1957**, 1171.
[32–33] Mudge, G. H., and J. V. Taggart: Amer. J. Physiol. **161**, 173 u. 191 (1950).
[34] Pullman, T. N., A. S. Alving, R. J. Dern and M. Landowne: J. Lab. clin. Med. **44**, 320 (1954).
[35] Reubi, F. C., and P. H. Futcher: J. clin. Invest. **28**, 440 (1949).
[36] Roe, J. H., J. H. Epstein and N. P. Goldstein: J. biol. Chem. **178**, 839 (1949).
[37] Schachter, D., and N. Freinkel: Amer. J. Physiol. **167**, 531 (1951).
[38] Schachter, D., and J. V. Taggart: J. biol. Chem. **203**, 925 (1953).
[39] Selkurt, E. E., P. W. Hall and M. P. Spencer: Amer. J. Physiol. **159**, 369 (1949).
[40] Smith, H. W.: The Kidney, p. 164ff., 544. New York. Oxford University Press 1951.
[41] Taggart, J. V.: Symp. on the Kidney. Ciba Found., London. J. A. Churchill 1954.
[42] Taggart, J. V., and R. P. Forster: Amer. J. Physiol. **161**, 167 (1950).
[43] Talbott, J. H., L. J. Pecora, R. S. Melville and W. V. Consolazio: J. clin. Invest. **21**, 107 (1942).
[44] Thibault, O.: Ann. Endocr. (Paris) **14**, 732 (1953).
[45] Tomich, E. G., and E. A. Woollett: Lancet **264**, 726 (1953).
[46] Waterhouse, C., and E. H. Keutmann: J. clin. Invest. **27**, 372 (1948).
[47] Wiebelhaus, V. D., K. H. Beyer, H. F. Russo, F. T. Brennan and E. R. Wynosky: Fed. Proc. **12**, 155 (1953).
[48] Wirz, H.: Helvet. physiol. pharmacol. Acta **14**, 353 (1956).

Nachtrag bei der Korrektur. Im Rahmen eines im Mai 1958 im Amer. J. Med. **24**, 774 (1958) veröffentlichten „Symposium on Renal Physiology" hat Taggart bezüglich des tubulären PAH-Transportes neue biochemische Gesichtspunkte entwickelt, die zum Verständnis der von uns hier vorgetragenen Versuchsergebnisse von besonderem Interesse sein dürften. Er gab für den Acetateffekt auf Tm_{PAH} noch eine andere Erklärung als die von uns eingangs zitierte, wonach Acetyl-CoA den aktivierten Träger beim Transport darstellt und der PAH-Transport eine Alkylaustauschreaktion zur Gewinnung von p-Aminohippuryl-CoA als Transportstoffwechselprodukt einschließt. Entscheidend war der Befund von Schachter, D., J. G. Manis u. J. V. Taggart [Amer. J. Physiol. **182**, 537 (1955)], daß die Niere Enzyme zur Synthetisierung einer Reihe von Alkylglykokollverbindungen besitzt. Danach werden nämlich Acetat und Fettsäuren in Gegenwart von ATP, CoA und eigener aktivierender Fermente in aliphatische Alkylderivate von CoA umgewandelt, die ihrerseits wieder unter dem Einfluß von Glykokoll-N-Alkylase mit Glykokoll reagieren. Die chemische Verwandtschaft der entsprechenden aliphatischen Glykokollverbindungen mit PAH, einem aromatischen Alkylglykokoll, könnte eine Erklärung für die Konkurrenzerscheinungen dieser Substanzen um das PAH-Transportsystem sein. Wahrscheinlich ist Tm_{PAH} durch gewisse aliphatische Alkylglykokollverbindungen, die bei der Fettsäuresynthese und -oxydation über Alkyl-CoA entstehen, stets etwas gehemmt. Dagegen bewirkt Zufuhr von Acetat dadurch eine Förderung von Tm_{PAH}, daß es in Form von nicht konkurrenzfähigem Acetylglykokoll diese endogene Hemmung aufheben kann.

Dr. Dieter P. Mertz, Medizinische Klinik des Städtischen Krankenhauses Bad Cannstatt, Stuttgart-S, Leonberger Str. 220

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 233—246 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Darstellung und chemische Untersuchung toxischer Ricinfraktionen

Von

D. Schöne

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1958)

Die toxische Komponente des Ricins ist wahrscheinlich ein Eiweißkörper, der sich im Nährgewebe der Samen von Ricinus communis L. befindet. Erste ausführliche Arbeiten über die Natur des Ricinusgiftes stammen von Kobert und seinem Schüler Stillmark (1889). Kobert u. Stillmark behaupten auf Grund ihrer Untersuchungen, Ricin sei ein Albumin, eine sogenannte Phytalbumose. Müller (1899) und Jacoby (1901) sowie die Schüler Schmiedebergs Dixson (1887) und Cushny (1898) versuchten, die toxische Substanz zu isolieren. Viele ihrer Versuchsergebnisse sprachen gegen die Eiweißnatur des Ricins, doch gelang es ihnen nicht, das Gift vom Eiweiß zu trennen.

Die Frage der Einheitlichkeit des Ricins, die vor allem in den älteren Arbeiten häufig diskutiert wurde, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden.

Angeregt durch die Arbeiten Emil von Behrings über die Immunisierung von Tieren gegen Diphtherie- und Tetanustoxin beschäftigte sich auch Paul Ehrlich (1891) mit dem Ricin. Er konnte nachweisen, daß sich eine antitoxische Immunität gegen Ricin bei Tieren auch nach oraler Verabreichung erzielen läßt. Als Erster beschrieb er die starke entzündungserregende Wirkung. Nicht tödliche Ricinmengen in der Größenordnung von 1—2 γ/kg und darunter erzeugten bei subcutaner Injektion oder bei lokaler Applikation am Kaninchenauge heftige Entzündungen und ausgebreitete Nekrosen.

Im Jahre 1924 versuchten dann Karrer u. Mitarb. eine Fraktionierung des Ricins durch Adsorption an verschiedene anorganische Adsorbentien. Die gleichen Autoren bestimmten auch mit der Estermethode nach Fischer (1901) die Aminosäurezusammensetzung des Ricins, ohne dabei bemerkenswerte Unterschiede gegenüber anderen Proteinen feststellen zu können.

Kabbat, Heidelberger u. Beezer (1947) stellten durch fraktionierte Salzfällung mehrere Ricinfraktionen mit verschiedener Toxicität her. Sie fanden, daß im Ricinussamen ein höherer Anteil immunulogisch

wirksames als toxisches Protein vorhanden ist. Ihre wirksamste Ricinfraktion B 1 verglichen die Autoren mit dem von Kunitz u. McDonald (1948) kristallin dargestellten Ricinpräparat. Durch Bestimmung des Molekulargewichtes, der elektrophoretischen Wanderung, des iso-elektrischen Punktes und durch immunologische Untersuchungen versuchten sie zu beweisen, daß sowohl ihre Ricinfraktion B 1 als auch das kristallisierte Ricin von Kunitz u. McDonald einheitliche Proteine seien.

In den folgenden eigenen Versuchen wird die Darstellung toxischer Ricinfraktionen beschrieben, deren chemische Struktur geprüft wurde.

Methodik

Darstellung der untersuchten Ricinpräparate. 1 kg Ricinussamen wurde im Starmix unter Zusatz von Tetrachlorkohlenstoff zerkleinert und anschließend abgepreßt. Der Preßrückstand wurde noch zweimal in gleicher Weise behandelt. Das so entfettete Samenpulver wurde im Vakuum getrocknet (Trockengewicht: 560 g). Dieses Pulver wurde bei 3—4° C zweimal 24 Std mit je 2 l 10%iger NaCl-Lösung extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden solange gegen Aqua dest. dialysiert, bis eine Probe der Außenflüssigkeit mit $AgNO_3$ nur noch eine schwache Opalescenz zeigte. Der bei der Dialyse ausgefallene Globulinanteil wurde abzentrifugiert und verworfen. Die Proteine in der überstehenden Flüssigkeit wurden durch Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt und nach 15 Std (bei 10° C) abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit einer ausreichenden Menge Aqua dest. in Lösung gebracht, dialysiert und von unlöslichen Anteilen durch Zentrifugieren befreit. Die klare, gelblich-braune Lösung wurde noch zweimal in der beschriebenen Weise umgefällt, bis sich in der dialysierten Lösung kein Niederschlag mehr bildete. Die so erhaltene klare und farblose Proteinlösung wurde halbiert. Die eine Hälfte wurde eingefroren (Aceton-Kohlensäure-Kältemischung) und daraus durch Gefriertrocknung das gesamte Ricin als weißes, amorphes Pulver gewonnen (R ges., Ausbeute: 2 g).

Die andere Hälfte der Lösung wurde mit Ammoniumsulfat zu $^1/_3$ gesättigt und 24 Std bei 3—4° C stehengelassen. Der geringfügige Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Lösung wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zur Halbsättigung versetzt und nach 24 Std (bei 10° C) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit wenig Wasser in Lösung gebracht, dialysiert und noch einmal in der beschriebenen Weise umgefällt. Die so erhaltene farblose, klare Lösung wurde eingefroren (Aceton-Kohlensäure-Kältemischung) und daraus durch Gefriertrocknung die Ricinfraktion R 1 als weißes, amorphes Pulver gewonnen (Ausbeute: 410 mg).

Der bei Halbsättigung nicht ausgefallene Proteinanteil wurde durch Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt, abzentrifugiert und durch Dialyse entsalzen. Durch Einfrieren und Gefriertrocknung wurde daraus die Ricinfraktion R 2 gewonnen (Ausbeute: 1,35 g).

Alle drei Ricin-Präparate (R ges., R 1 und R 2) stellten weiße, sehr voluminöse Pulver dar, die sich in Wasser klar lösten.

Papierelektrophorese. Die Papierelektrophorese wurde nach dem von Grassmann u. Hannig (1952) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Als Pufferlösung bewährte sich ein Veronalpuffer, bestehend aus 0,1 m diäthylbarbitursaurem Natrium und 0,02 m Diäthylbarbitursäure (p_H 8,6). Das Optimum der Auftrennung lag bei einer Laufzeit von etwa 20 Std. Für alle Versuche wurde Whatman-Papier Nr. 1 benutzt.

Die präparative Trennung des Ricins wurde folgendermaßen durchgeführt: auf einem mit Pufferlösung befeuchteten Bogen von 25 × 30 cm wurde über die ganze Breite 0,1 ml Ricinlösung aufgetragen. Nach 20stündiger Elektrophorese wurde der Bogen waagerecht auf ein Trockengestell gespannt und sofort im Kälteraum bei — 6° C eingefroren. Dann wurden von beiden Seiten des Bogens 2,5 cm breite Streifen abgeschnitten, getrocknet und wie bei der qualitativen Papierelektrophorese angefärbt. Nach Anlegen der gefärbten Streifen wurden die einzelnen Fraktionen markiert und abgeschnitten. Dabei wurde so verfahren, daß der zwischen zwei Fraktionen liegende Streifen verworfen wurde, um eine saubere Trennung der Fraktionen zu gewährleisten. Die den einzelnen Fraktionen entsprechenden Papierstreifen wurden noch in gefrorenem Zustande zerschnitten und in einem Reagensglas mit je 3 ml 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert. Nach zweistündigem Stehen wurde zentrifugiert, zweimal mit 1,0 ml NaCl-Lösung gewaschen und auf 5 ml aufgefüllt.

Die quantitative Auswertung der Pherogramme erfolgte nach der von Turba (1954) beschriebenen Methode.

Bestimmung der Sedimentationskonstante der Ricinfraktion R 1[1]. Die Bestimmung der Sedimentationskonstante wurde mit einer 1%igen Lösung der Ricinfraktion R 1 in 0,2 m Na_2HPO_4-Lösung in der Ultrazentrifuge bei 52000 U/min = 180000 g durchgeführt.

Die Aufnahme des abgebildeten Gradienten erfolgte mit der Philpot-Swensson-Optik. Der Wert für die Sedimentationskonstante wurde nach der Lammschen Skalenmethode errechnet.

Die Aminosäurezusammensetzung des Ricins[2]. Die Aminosäurezusammensetzung des Ricinpräparates R 1 wurde nach einer ursprünglich von Levy (1955) angegebenen Methode in der Modifikation von Koch u. Weidel (1956) qualitativ und quantitativ bestimmt.

Prinzip: Das Proteinhydrolysat wird mit Dinitrofluorbenzol zu den gelbgefärbten DNP-Aminosäuren umgesetzt. Nach zweidimensionaler papierchromatographischer Trennung (aufsteigend: Toluol 5, Chloräthanol 3, Pyridin 1,5, 0,8 n — NH_3 3; absteigend: 1,5 m Phosphatpuffer p_H 6,0) werden die Flecken eluiert und die Lösungen bei 360 mμ gemessen.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sich die mit Fluordinitrobenzol zu den entsprechenden Dinitrophenylderivaten umgesetzten Aminosäuren durch ihre Eigenfärbung auf den Chromatogrammen zu erkennen geben und leicht quantitativ zu bestimmen sind. Bei der sonst üblichen Anfärbung der Aminosäuren mit Ninhydrin wird die quantitative Auswertung dadurch sehr erschwert, daß die Umsetzung des Ninhydrins mit der Aminosäure nicht exakt im stöchiometrischen

[1] Für die Bestimmung der Sedimentationskonstante in der Ultrazentrifuge danke ich Herrn Dipl.-Chem. Curt vom Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin.

[2] Die Einzelheiten dieser Methode finden sich in der Dissertation D. Schöne, Math.-Nat. Fakultät der Freien Universität Berlin (1957).

Verhältnis verläuft, stark p_H-abhängig ist und durch Spuren von Ammoniak empfindlich gestört wird. Dadurch werden unter anderem im Chromatogramm hohe und ungleichmäßige Leerwerte erhalten.

Diese Nachteile sind bei der DNP-Methode nicht vorhanden. DNP-Aminosäuren haben bis auf DNP-Prolin (385 mμ) die gleichen Extinktionsmaxima (360 mμ) und folgen streng dem Lambert-Beerschen Gesetz. Voraussetzung ist, daß durch die Papierchromatographie eine genügend scharfe Auftrennung der DNP-Aminosäuren erfolgt. Die Extinktionswerte der aus den Chromatogrammen eluierten DNP-Aminosäuren ergeben nach Multiplikation mit experimentell ermittelten Faktoren das Molverhältnis der Aminosäuren im Hydrolysat, da ein Mol DNP-Aminosäure einem Mol Aminosäure entspricht.

Bestimmung der endständigen Aminosäuren. Nach der Vorschrift von Sanger (1945) wurde die Ricinfraktion R 1 mit Fluordinitrobenzol zu Dinitrophenyl-Ricin (DNP-Ricin) umgesetzt.

Die enzymatische Hydrolyse des Ricins. 60 mg der Ricinfraktion R 1 wurden in 15 ml m/50 Phosphatpuffer (p_H 7,4) gelöst und in einen einseitig verschlossenen Dialysierschlauch gefüllt. Um zu prüfen, ob in der Lösung dialysable toxische Spaltprodukte des Ricins enthalten sind, wurde die Lösung 10 Tage bei 4° C gegen 20 ml Aqua dest. dialysiert, ohne die Außenflüssigkeit zu wechseln. Die Toxicitätsprüfung erfolgte durch Injektion von 0,5 ml der Außenflüssigkeit an 5 Mäusen. Alle Tiere blieben am Leben.

Anschließend wurden der Lösung im Dialysierschlauch 20 mg Trypsin (E. Merck) zugesetzt. Alle Glasgeräte und — soweit möglich — auch die Lösungen wurden vor Versuchsbeginn sterilisiert, da ein Zusatz von Desinfektionsmitteln die spätere Messung im UV gestört hätte. Die Lösung wurde im Brutschrank bei 37° C 46 Std gegen 30 ml Aqua dest. dialysiert, ohne die Außenflüssigkeit zu wechseln.

Um ein Maß für die bei der Trypsinhydrolyse in die Außenflüssigkeit dialysierten Spaltprodukte zu gewinnen, wurde in bestimmten Zeitabständen die UV-Absorption des Dialysates bei 275 mμ gemessen. Dazu wurden unter möglichst sterilen Bedingungen der Außenflüssigkeit 3 ml entnommen, die nach erfolgter Messung wieder zurückgegossen wurden.

In einem zweiten Ansatz wurde eine 5% ige Lösung des Ricinpräparates R 1 in Veronal-Na-Puffer (p_H 8) mit Trypsin versetzt und 60 Std bei 37° C belassen. Nach 1, 48 und 60 Std wurden dem Ansatz 0,08 ml entnommen und mit der bereits beschriebenen Methode eine Papierelektrophorese durchgeführt. Als Vergleich diente eine Lösung, die ohne Trypsin 60 Std bei 37° C gestanden hatte. Beide Lösungen waren mit Thymol konserviert.

Ergebnisse

Bestimmung der Toxicität. Die Toxicität der drei Ricinfraktionen wurde in orientierenden Versuchen an 20 g schweren Mäusen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Ricinfraktion R 1 am stärksten toxisch wirkt (Tab. 1).

Bei längerer Lagerung erleidet die Substanz einen Wirkungsverlust. So fand Kramer (1958) mit einem ein Jahr alten Ricinpräparat (R I) nur eine LD 50 von 19 γ/kg.

Vergiftungsverfauf. Nach Injektion einer tödlichen Dosis Ricin läßt sich an Ratten in der ersten Hälfte der Vergiftungszeit nichts außergewöhnliches feststellen. Freßlust und Beweglichkeit der Tiere sind normal. In der zweiten Hälfte der Vergiftungszeit machen die Tiere einen müden und kranken Eindruck, um schließlich in einen apathischen

Tabelle 1

Fraktion	γ/20 g Maus	Zahl der Versuchstiere	überlebend	tot	Latenzzeit
R 1	0,2—0,25	10	0	10	60—96 Std
	0,1	13	3	10	3—5 Tage
R 2	2—5	10	0	10	40—120 Std
	1,5—1,7	13	3	10	2—4 Tage
R ges.	2	3	0	3	96—120 Std
	1,2	10	1	9	4—6 Tage
	0,5	3	3	0	—

Tabelle 2

Gruppe	Ricin γ/kg	Anzahl der toten Ratten nach Stunden 12 15 18 31 24 27 36 48 54 65 89 96	gesamt tot	gesamt überlebend
1	1000	6* 2 2 — — — — — — — — —	10	0
2	500	6* 2 2 — — — — — — — — —	10	0
3	300	6* 2 1 — — — — — — — — —	9	1
4	100	3 2* 1 2 2 — — — — — — —	10	0
5	50	4 2* 0 2 2 — — — — — — —	10	0
6	20	0 0 0 0 2 1 4* 0 1 0 0 0	8	2
7	10	0 0 0 0 0 0 2 0 4* 1 0 1	8	2
8	8	0 0 0 0 0 0 0 1 3 0 0 2*	6	4
9	5	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1	1	9
10	3	0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0	2	8

Bei * sind mindestens 50% der Tiere tot.

Zustand zu verfallen, in dem sie nicht mehr in der Lage sind, sich mit den Vorderpfoten am Rand des Käfigs emporzuziehen. Kurz vor dem Tode sind sie fast völlig bewegungsunfähig. Ein Krampfstadium, wie es von einigen Autoren beschrieben wird, wurde nie beobachtet. Die Stellreflexe bleiben erhalten. In einer eigenartigen, zusammengekauerten Haltung sterben die Tiere regungslos meist ohne in Seitenlage zu kommen.

Der Ablauf der Ricinvergiftung ist jedoch durch eine Latenzzeit gekennzeichnet, die von der Dosis abhängig ist.

Im folgenden Versuch wurden 10 Gruppen zu je 10 Ratten steigende Mengen Ricin der Fraktion R 1 intraperitoneal gespritzt. Für jede Dosis wurde die Zeit ermittelt, nach der 50% der Tiere gestorben waren. Tab. 2 gibt einen Überblick über die Abhängigkeit der Latenzzeit von der Dosis. Bei einer Dosis von 8 γ/kg, die der LD 50 entspricht, starben 50% der Tiere nach einer Latenzzeit von 96 Std. Wurde die Ricindosis laufend bis auf das 10fache dieser LD 50 erhöht, so verringerte sich die Latenzzeit

Abb. 1. Elektrophoresediagramm der Gesamtfraktion des Ricins R ges.

Abb. 2. Pherogramm des Ricinpräparates R 1

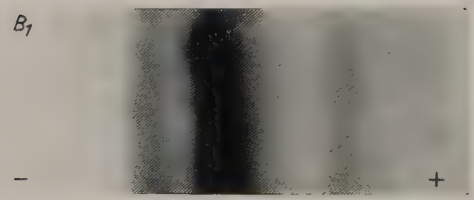


Abb. 3. Pherogramm des Ricinpräparates B 1 nach Kabbat, Heidelberger u. Beezer

auf 12 Std. Dieser Wert wurde auch bei extremer Steigerung der Dosis (bis über das 100fache der LD 50) nicht mehr unterschritten.

Papierelektrophorese. Es wurde gefunden, daß sich das Ricinpräparat R ges. aus 5 Fraktionen zusammensetzt (Abb. 1).

Das Ricinpräparat R 1 besteht nur aus 2 Fraktionen (Abb. 2).

Das Pherogramm des Ricinpräparates R 2 ließ ebenfalls wieder 5 Fraktionen erkennen.

Ein der Fraktion B 1 von Kabbat, Heidelberger u. Beezer entsprechendes Ricinpräparat wurde nach deren Vorschrift durch fraktioniertes Fällen mit Natriumsulfat hergestellt. Bei der Papierelektrophorese

trennte es sich in 2 Fraktionen (Abb. 3). Eine schwach ausgeprägte dritte Fraktion, die anodisch wanderte, konnte nicht in jedem Falle nachgewiesen werden.

Die quantitative Auswertung des Pherogrammes des Ricinpräparates R ges. ergab folgende Werte:

Fraktion 1: 13,2%
Fraktion 2: 23,6%
Fraktion 3: 23,0%
Fraktion 4: 26,3%
Fraktion 5: 13,9%.

Die bei der präparativen Trennung isolierten 5 Fraktionen des Ricinpräparates R ges. waren alle toxisch.

Bestimmung der Sedimentationskonstante der Ricinfraktion R 1. Für die Ricinfraktion R 1 wurde die Sedimentationskonstante

$$S_{20} = 4{,}78 \cdot 10^{-13} \text{ SVEDBERG}$$

gefunden. Dieser Wert entspricht einem Molekulargewicht von etwa 70—75000.

Im Vergleich dazu seien die Werte angegeben, die andere Autoren fanden:

Autoren	Präparat	S_{20}	Mol.-Gew.
KABBAT, HEIDELBERGER u. BEEZER	B 1	$5{,}3 \cdot 10^{-13}$	85000
KABBAT, HEIDELBERGER u. BEEZER	krist. Ricin	$4{,}8 \cdot 10^{-13}$	77000
KUNITZ, MCDONALD	krist. Ricin	$3{,}9 \cdot 10^{-13}$	36000
Y. MOULÉ	Tb	$4{,}5 \cdot 10^{-13}$	—
eig. Untersuchung	R 1	$4{,}78 \cdot 10^{-13}$	75000

Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung. Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, sind bis auf Leucin/iso-Leucin alle Aminosäuren gut getrennt. Auch Glutaminsäure und Asparaginsäure, die in den Chromatogrammen von LEVY (1955) zusammenwanderten, sind deutlich unterschieden. Tab. 3 zeigt das Ergebnis der quantitativen Bestimmung. Die Berechnung der molaren Verhältnisse der Aminosäuren ergibt sich wie folgt: Die jeweils gemessenen Extinktionswerte der aus den Chromatogrammen eluierten DNP-Aminosäuren werden mit den zugehörigen Faktoren multipliziert. Die Summe dieser Werte wird gleich 100 gesetzt. Die angegebenen Zahlen in den Spalten 1—4 sind die errechneten prozentualen Anteile jeder Aminosäure. Aus den Mittelwerten wird das molare Verhältnis errechnet, indem die Aminosäure mit der geringsten Konzentration (Methionin) gleich 1 gesetzt wird.

Bei der Endgruppenbestimmung des Ricins mit Fluordinitrobenzol wurde nur DNP-ε-Lysin als ätherunlösliche DNP-Aminosäure gefunden. Die Identifizierung des DNP-ε-Lysins erfolgte papierchromatographisch durch Vergleich mit authentischem DNP-ε-Lysin in verschiedenen Lösungsmitteln. Eine „echte" endständige Aminosäure konnte nicht erfaßt

Tabelle 3

	1.	2.	3.	4.	Mittelwert	molare Verhältnis
Glu	15,3	15,8	15,8	14,5	15,4	14
Asp	12,0	11,4	11,9	11,0	11,6	11
Leu	16,0	16,7	16,5	17,1	16,5	15
Ser	7,8	7,7	7,3	7,3	7,6	7
Gly	8,4	7,9	7,4	8,0	7,9	7
Ala	6,7	6,4	6,4	6,1	6,4	6
Pro	6,1	5,6	5,9	5,8	5,9	5
Thre	6,1	6,7	6,8	6,8	6,6	6
Val	5,3	5,4	5,7	6,7	5,8	5
Lys	1,8	1,9	1,9	1,8	1,9	2
Phen	3,3	3,6	3,6	4,0	3,6	3
Cystin	1,8	1,7	1,8	1,8	1,8	2
Tyr	2,4	2,4	2,3	2,7	2,4	2
Meth	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1
Arg	4,6	4,6	4,6	4,1	4,5	4
His	1,3	1,0	1,3	1,5	1,3	1
	100,1	100,2	100,2	100,2	100,3	91

Tryptophan (spektrophotometrisch): 2,8% = 0,014 mol-%.

werden. Das Hydrolysat des geringfügigen gelben Rückstandes der Ätherfraktion zeigte nach papierchromatographischer Trennung beim Anfärben mit Ninhydrin die Banden mehrerer Aminosäuren in sehr geringer Konzentration. Da die Konzentration dieser Aminosäuren jedoch im Verhältnis zum DNP-ε-Lysin nur sehr gering ist, können sie nicht als endständige Aminosäuren gewertet werden.

Nach Thompson u. Göllner (1954) handelt es sich dabei entweder um Verunreinigungen oder um Spuren von Spaltprodukten, die bei der Einwirkung von Fluordinitrobenzol auf das Protein in alkalischem Milieu entstanden sind, da diese geringen Mengen auch bei Proteinen ohne N-endständige Aminosäuren beobachtet wurden. Auch Grassmann u. Hörmann (1953) fanden, daß z. B. bei Gelatine die N-terminalen Aminosäuren abhängig sind vom Ausgangsprodukt. Zu einem ähnlichen negativen Ergebnis kamen auch Schramm u. Braunitzer (1955) bei der Bestimmung der N-endständigen Aminosäuren des Tabak-Mosaikvirus. Am nativen Virus konnten sie ebenfalls keine endständigen Aminosäuren nachweisen. Erst nach Behandlung des Virus mit Trichloressigsäure (p_H 1,8, 30 min, 85° C) fanden sie Prolin als endständige Aminosäure.

Die enzymatische Hydrolyse des Ricins. Nach dreitägiger Trypsinhydrolyse ist die Toxicität des Ricins nicht verändert. 10 Mäuse erhielten

1 γ/20 g Maus des Ricinpräparates R 1 vor und nach der 3tägigen Trypsinhydrolyse.

In beiden Fällen starben die Tiere innerhalb von 24 Std. Ebenso zeigten Pepsin und Papain keinen Einfluß auf die Toxicität des Ricins.

Es wurde jedoch gefunden, daß bei der beschriebenen Versuchsanordnung dialysable Spaltprodukte entstehen, die ebenfalls toxisch sind.

Abb. 4. Zweidimensionales Papierchromatogramm der DNP-Aminosäuren nach Hydrolyse des Ricins

Als Maß für die enzymatische Hydrolyse des Ricins wurde die UV-Absorption des Dialysates bestimmt. Tab. 4 zeigt die Zunahme der Extinktionswerte während des Versuches und das Ergebnis der Toxicitätsbestimmung des Dialysates.

Während der Trypsinhydrolyse wurde ein Ansatz nach 1, 48 und 60 Std papierelektrophoretisch aufgetrennt. Die Pherogramme der mit Trypsin versetzten Ricinlösung zeigten, daß es bei der enzymatischen Hydrolyse offensichtlich zu einer erheblichen Veränderung des Proteins kommt.

Tabelle 4

Stunden nach Trypsinzusatz	E bei 275 mμ	8 Mäuse je 0,5 ml des Dialysates i.p.	
		überlebend	tot
5	240	8	0
22	660	0	8 (60—96 Std)
29	867	0	8 (60—96 Std)
46	1142	0	8 (24—60 Std)

Während nach einstündiger Trypsineinwirkung deutlich das Auftreten von 2 neuen Fraktionen zu sehen war, zeigten die Pherogramme nach 48 und 60 Std das Bild eines denaturierten Proteins.

Die Oxydation des Ricins mit Natriumhypochlorit. Da Ricin eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber proteolytischen Fermenten und, wie in eigenen Versuchen festgestellt werden konnte, auch gegenüber H_2O_2 besitzt, sollte untersucht werden, welchen Einfluß Natriumhypochlorit auf das Ricin ausübt. Es interessierte vor allem die Frage, bei welcher NaOCl-Konzentration die toxische Wirkung des Ricins verschwindet und welche chemischen Veränderungen dadurch am Ricinmolekül hervorgerufen werden. Ferner sollte untersucht werden, ob das durch NaOCl inaktivierte Ricin noch entzündungserregend wirkt.

Es wurde gefunden, daß die toxische Wirkung des Ricins schon bei einem Verhältnis von 0,045 mg NaOCl/1 mg Ricin aufgehoben wird. Von den Tieren wurde die Dosis von 1000 γ/kg, d. h. etwa das hundertfache der LD 50 des Ausgangsproduktes, ohne sichtbare Reaktionen vertragen.

Dagegen war die entzündungserregende Wirkung des oxydierten Ricins noch deutlich vorhanden.

Die papierchromatographische Analyse der Aminosäuren des oxydierten Ricins ergab, daß zwischen Lysin und Phenylalanin 4 neue Flecken auftreten, die nicht identifiziert werden konnten.

Diskussion

Bei Durchsicht der Ricinliteratur fällt auf, daß sich die teilweise nach gleichen Verfahren gewonnenen Präparate oft erheblich in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. Besonders die Angaben der älteren Literatur lassen erkennen, daß bei der Darstellung des Ricins die für das Arbeiten mit Eiweißkörpern erforderlichen Vorsichtsmaßregeln nicht immer genügende Berücksichtigung fanden. Sehr oft dürfte die Extraktion des Ricinpreßkuchens mit Alkohol und das Eintrocknen der stark salzhaltigen Ricinlösung für den großen Wirkungsverlust verantwortlich sein.

Besonders wirksame Ricinpräparate sind in den letzten Jahren von Kunitz u. McDonald, Heidelberger u. Mitarb. und Y. Moulé (1951) hergestellt worden. Im Prinzip unterscheiden sich die Methoden dieser Autoren nicht voneinander. Heidelberger u. Mitarb. gewannen ihre wirksamste Fraktion B 1 durch Fällen mit Natriumsulfat bei 37° C. Bei dem von Y. Moulé angegebenen Verfahren wird die wirksamste Fraktion Tb bei Zimmertemperatur durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Vergleicht man an Hand einer Löslichkeitskurve die Na_2SO_4-Konzentration bei 37° C mit den für 20° C geltenden Werten, so kommt die von Heidelberger u. Mitarb. zur Fällung benutzte Konzentration praktisch auch einer Halbsättigung gleich. Zwischen diesen Präparaten besteht auch kein wesentlicher Unterschied in der Toxicität.

Das von Kunitz u. McDonald kristallin dargestellte Ricin wurde dadurch gewonnen, daß eine Na_2SO_4-haltige konzentrierte Ricinlösung auf den isoelektrischen Punkt des Ricins (p_H 5,2—5,5) eingestellt wurde.

Nach dreiwöchigem Stehen bei 5° C hatte sich ein Niederschlag gebildet, der noch einige Male in der gleichen Weise umkristallisiert wurde.

Das wirksamste eigene Präparat (R 1) wurde ebenfalls durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gewonnen. Somit unterscheidet sich also das eigene Verfahren nicht grundsätzlich von dem der anderen Autoren. Auch in der Toxicität des Ricinpräparates R 1 ergibt sich kein Unterschied zu den oben angeführten Präparaten.

Vergleicht man jedoch die Methoden und die Ergebnisse, mit denen die Autoren die Einheitlichkeit ihrer Präparate beweisen, so werden widersprechende Angaben gefunden. Kunitz, Heidelberger u. Mitarb. und Y. Moulé untersuchten ihre Präparate in der Tiselius-Apparatur. Die beiden ersten Autoren berichten, daß sich ihre Präparate wie einheitliche Eiweißkörper verhalten. Sie machen jedoch keine näheren Angaben über ihre Versuchsbedingungen; auch geht aus ihren Arbeiten nichts über die Elektrophoresedauer hervor, die aber, wie Y. Moulé zusammen mit Wiedemann zeigen konnte, für die Beweisführung der Einheitlichkeit der Ricinfraktionen entscheidend ist. Das von Y. Moulé dargestellte Ricinpräparat Tb täuschte bei der üblichen Elektrophoresedauer von 1½ Std eine Einheitlichkeit vor. Bei längerer Versuchsdauer (3—8 Std) zeigte sich jedoch, daß das Ricinpräparat Tb zu gleichen Teilen aus zwei Komponenten mit wenig verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit besteht, obwohl der p_H-Bereich von 2,7—8,6 variiert wurde. Die Auftrennung des Ricinpräparates Tb in seine Komponenten A und B konnte auf Grund des geringen Unterschiedes in der Wanderungsgeschwindigkeit nur durch eine längere Elektrophoresedauer erfolgen. Die isolierten Komponenten A und B hatten dasselbe Molekulargewicht und die gleiche Toxicität.

Gegenüber der Tiselius-Elektrophorese besitzt die Papierelektrophorese einige Vorteile. Wie Turba beweisen konnte, ist bei der Papierelektrophorese häufig eine größere Trennschärfe möglich. Auch das von mir dargestellte Ricinpräparat R 1 bestand aus 2 Fraktionen. Ob diese Fraktionen mit den Komponenten A und B des Ricinpräparates Tb von Y. Moulé identisch sind, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Interessant ist jedoch in diesem Zusammenhang, daß auch das nach der Vorschrift von Heidelberger u. Mitarb. hergestellte Ricinpräparat B 1 papierelektrophoretisch in 2 Komponenten aufgetrennt werden kann. Da sich aber die zur Diskussion stehenden Ricine einschließlich des eigenen Präparates R 1 in ihrer Herstellung und Wirksamkeit kaum unterscheiden, dürfte die mit der Papierelektrophorese erfolgte Auftrennung des Ricins R 1 mit als Beweis dafür gelten, daß die aus dem Ricinussamen isolierten Proteine keine einheitlichen Substanzen sind. Dagegen spricht auch das Verhalten bei der enzymatischen Hydrolyse. Untersuchungen in dieser Richtung finden sich vor allem in der älteren Literatur. Jedoch

ist kein Kapitel der Ricinforschung reicher an widersprechenden Angaben als dieses.

Am eingehendsten haben Karrer u. Mitarb. die enzymatische Hydrolyse des Ricins untersucht. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß die toxische Komponente des Ricins von proteolytischen Fermenten nur sehr schwer angegriffen wird. Die Autoren dehnten ihre Verdauungsversuche mit Trypsin auf 5—9 Monate aus und konnten zeigen, daß sich ein Absinken der Toxicität nur proportional der Eiweißverdauung, gemessen an der Zunahme der freien Aminogruppen nach van Slyke, vollzieht. Die eigenen Versuche beschränkten sich auf eine Zeit von 48 bis 60 Std.

In der Methodik der enzymatischen Hydrolyse unterscheiden sich jedoch die eigenen Versuche von denen von Karrer u. Mitarb. in einem wesentlichen Punkte. Während diese Autoren nach der Trypsineinwirkung solange dialysierten, wie die Ninhydrinprobe positiv verlief (bei Verwerfung des Dialysates!), konnte mit den eigenen Versuchen gezeigt werden, daß bereits nach 24stündiger Trypsineinwirkung dialysable toxische Spaltprodukte auftreten.

Aber noch ein anderer Befund von Karrer u. Mitarb. verdient Beachtung. Die Autoren fanden, daß das aus einem Hydrolyseversuch isolierte, noch toxische Ricin 2,5—3% weniger Stickstoff enthält. Diese Stickstoffdifferenz betrifft lediglich die basischen Aminosäuren und unter diesen wiederum nur das Arginin. Es müssen also Argininguanidinogruppen abgespalten und das Arginin dadurch in Ornithin verwandelt worden sein. Trotz dieser konstitutionellen Veränderung konnte aber kein Absinken der Toxicität festgestellt werden. Das aus einem Verdauungsversuch isolierte Ricin hatte stets die gleiche Wirkung wie das Ausgangsprodukt.

Daß bei der Trypsin-Hydrolyse eine tiefgreifende Veränderung des Ricinmoleküls erfolgen muß, zeigt auch die papierelektrophoretische Kontrolle des Ricins während des Verdauungsversuches. Diese Veränderungen treten jedoch schon nach einer Stunde auf. 48—60 Std nach dem Trypsinzusatz zeigt das Pherogramm bereits das Bild eines stark denaturierten Proteins, während die Desaminierung des Arginins von Karrer u. Mitarb. erst nach wochenlanger Trypsineinwirkung nachgewiesen werden konnte.

Die Resistenz des Ricins gegenüber proteolytischen Fermenten spricht dafür, daß Ricin unter den Eiweißstoffen eine Sonderstellung einnehmen muß. Bei dem Versuch, die endständigen Aminosäuren nach der Methode von Sanger mit Fluordinitrobenzol zu bestimmen, konnte nur DNP-ε-Lysin nachgewiesen werden. Eine „echte" N-endständige Aminosäure wurde jedoch nicht gefunden. Schramm u. Braunitzer, die die gleiche Beobachtung bei der Endgruppenbestimmung des

Tabak-Mosaikvirus machten, vermuten, daß die N-terminalen Aminosäuren (beim Tabak-Mosaikvirus) maskiert sind. Erst nach Vorbehandlung Tabak-Mosaikvirus mit Trichloressigsäure, d. h. durch eine schwache saure Hydrolyse, konnten die Autoren Prolin als N-endständige Aminosäure nachweisen. Die Resistenz des Ricins gegenüber proteolytischen Fermenten könnte unter Umständen in ähnlicher Weise erklärt werden.

Bei der Oxydation des Ricins mit NaOCl konnte gezeigt werden, daß die toxischen und die entzündungserregenden Eigenschaften unabhängig voneinander beeinflußt werden. Die toxische Wirkung von 1 mg Ricin wird bereits durch 0,045 mg NaOCl vollkommen aufgehoben, während die entzündungserregende Wirkung erhalten bleibt.

Auch dieser Befund spricht dafür, daß die bekannten toxischen und entzündungserregenden Wirkungen des Ricins nicht die Eigenschaften einer einheitlichen Verbindung sein können.

Die bisher aus dem Ricinussamen isolierten Eiweißfraktionen, die zunächst einheitlich erschienen, sind sehr wahrscheinlich aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt, die mit den üblichen Methoden der Eiweißchemie nicht aufgetrennt werden konnten. Die auffällige Beobachtung, daß dialysable hoch toxische Produkte nach Einwirkung von Trypsin auf Ricin festgestellt werden können, läßt daran denken, daß möglicherweise niedermolekulare, vielleicht cyclische Polypeptide abgetrennt wurden, die in dem nativen Ausgangsprodukt an hochmolekulares Eiweiß gebunden sein können.

Bei dem gegenwärtigen Stand der Untersuchungen ist allerdings noch nicht zu übersehen, in welcher Form diese noch hypothetischen Produkte untereinander gebunden sind, da sich auch in dem hochmolekularen Eiweißkörper keine freien endständigen Aminogruppen nachweisen ließen. Auffallend ist eine gewisse Ähnlichkeit der Symptome mit der Vergiftung durch Phalloidin (M. Vogt 1938) aus dem Knollenblätterpilz, dessen ringförmige Polypeptidstruktur von Wieland (1940) aufgeklärt wurde.

Außer dem Phalloidin enthält der Knollenblätterpliz noch das Polypeptid Amanitin, dessen Vergiftungsbild ebenfalls dem des Ricins sehr ähnlich ist. Auch die Amanitinvergiftung ist durch eine Latenzzeit gekennzeichnet, die von der Dosis abhängig ist (Wieland u. Reiter 1952).

Summary

The Toxin ricin, a protein, was isolated from the seed of Ricinus ommunis L. 0,1 μg of the most toxic fraction R 1 killed a mouse (20 g) after an intervall of 4 days.

The molecular weight of this substance is 70—75000. The aminoacids were qualitatively and quantitatively determined after reaction of the

hydrolized ricin with fluoro-dinitro-benzene. N-terminalaminoacids were not detected in the fraction R 1. The reaction of ricin with trypsin and hypochlorite was studied. Trypsin and similar proteolytic enzymes did not alter the toxicity of ricin. But the hydrolysis with trypsin did thoroughly change the molecule of ricin. After reaction with hypochlorite the lethal effect of ricin disappeared, but the property to elicit a local inflammatory reaction did notdecrease.

The results were discussed. The isolated fraction R 1 of ricin as well as the fractions of ricin prepared by Y. Moulé and Heidelberger are not pure and homogenous substances.

Literatur

Cushny, A. R.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **41**, 439 (1898).
Dixson: zit. bei A. R. Cushny.
Ehrlich, P.: Dtsch. med. Wschr. (**1891**) 976, 1218.
Fischer, E.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **33**, 151 (1901).
Göllner, I.: Behringwerk-Mitteilungen, Heft 30, S. 46 (1955).
Grassmann, W., u. K. Hannig: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **290**, 1 (1952).
Grassmann, W., u. H. Hörmann: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **292**, 24 (1953).
Jacoby, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **46**, 36 (1901).
Kabbat, A., M. Heidelberger and E. Beezer: J. biol. Chem. **168**, 629 (1947).
Kobert, R.: Lehrbuch der Intoxikationen, Bd. II, S. 695, Verlag F. Enke (1906).
Kramer, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 125 (1958).
Koch, G., u. W. Weidel: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **303**, 213 (1956).
Kunitz, M., and McDonald: J. gen. Physiol. **32**, 25 (1948).
Karrer, P., A. P. Smirnoff, H. Ehrensperger, I. van Sloten u. M. Keller: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **135**, 129 (1924).
Levy, A. L., I. I. Geschwind and C. H. Li: J. biol. Chem. **213**, 187 (1955).
Moulé, Y.: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **33**, 1467 (1951). — Arch. Sci. physiol. **5**, 227 (1951).
Müller, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **42**, 303 (1899).
Osborn, Th. B., L. B. Mendel and J. F. Harris: Amer. J. Physiol. **14**, 259 (1905).
Sanger, F.: Biochem. J. **39**, 507 (1945).
Schramm, G., G. Braunitzer and J.W. Schneider: Nature (Lond.). **176**, 456 (1955).
Stillmark: Arbeiten aus dem Pharmakol. Institut zu Dorpat, **3**, 59 (1889).
Thompson, E. O. P.: J. biol. Chem. **207**, 561 (1954).
Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Proteinchemie. Springer Verlag 1954.
Vogt, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **190**, 406 (1938).
Wiedemann, E.: zit. bei Y. Moulé.
Wieland, O., H. Fischer u. M. Reiter: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 75 (1952).
Wieland, H., u. B. Witkop: Liebigs Ann. **543**, 171 (1940).

Dr. Dieter Schöne, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69—73

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 247—263 (1958)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Göttingen

Einflüsse von Curare und Flaxedil auf die Muskelspindeln des Frosches*

Von

H.-D. Henatsch und F. J. Schulte

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1958)

Das Bedürfnis nach einer Pharmakologie der Muskelspindeln ist in dem Maße gestiegen, wie ihre große Bedeutung für die normale und pathologische Motorik zunehmend erkannt worden ist. Neuere Untersuchungen haben die Morphologie der Spindeln und ihrer Hilfseinrichtungen (siehe für Warmblüter: Barker 1948; für Kaltblüter: Gray 1957) sowie ihr elektrophysiologisches Verhalten weitgehend geklärt (zusammenfassende Darstellung mit Literatur: Granit 1955). Wir kennen heute die wesentlichsten Faktoren, welche aktiven Einfluß auf die afferenten Entladungsmuster dieser Proprioceptoren nehmen können: 1. die Erregbarkeit und die Reizbedingungen der eigentlichen *sensorischen Endorgane*, 2. der Zustand ihrer contractilen Binnenfasern *(intrafusale Muskulatur)*, deren Anspannung die Endorgane von „innen" her zu erregen vermag; 3. die neuromuskulären Übertragungsbedingungen efferenter Impulse auf die Spindelmuskulatur an ihren eigenen, *intrafusalen Endplatten* und 4. die *zentralen, supraspinalen Antriebe* der efferenten Spindel-Innervation. Von Kontraktionsänderungen der umgebenden, extrafusalen Skeletmuskulatur können wir absehen, da ihre Wirkungen (Entlastungseffekt auf die Spindeln) lediglich indirekt-passiver Natur sind.

Nach den gleichen Gesichtspunkten sind die verschiedenen Angriffsmöglichkeiten für pharmakologische Einwirkungen auf die Spindeln abzugrenzen. Einige Beispiele hierfür sind bereits bekannt. So werden durch Zwischenneuronengifte vom Typ des *Myanesin* die supraspinalen Erregungszuströme nicht nur für die Motoneurone der extrafusalen Skeletmuskulatur, sondern — in höheren Dosen — auch für die der intrafusalen Spindelmuskulatur unterdrückt (Granit u. Holmgren 1955). Eine weitgehend selektive Hemmung der zentralen Spindelinnervation beim Warmblüter („Gamma-Antriebe") gelingt an ihren vorwiegend supraspinalen Ursprungsgebieten durch *Chlorpromazin* (Henatsch u. Ingvar 1956) und andere Phenothiazine. *Acetylcholin* und die depolarisierenden Muskel-Relaxantien *(Succinylcholin, Decamethonium)* besitzen starke

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

periphere Erregungswirkungen auf die sensorischen Endorgane der Spindeln sowie — in der präparalytischen Phase — auf ihre intrafusalen Endplatten. Sie wurden am Warmblüter von Hunt (1952), Granit, Skoglund u. Thesleff (1953) und von Eldred u. Mitarb. (1957), am Kaltblüter von Henatsch u. Schulte (1957, 1958) sowie von Smith u. Unna (1956) untersucht.

In der vorliegenden Arbeit soll über die Einflüsse der Relaxantien *Curarin* und *Flaxedil* auf die Muskelspindeln des Frosches berichtet werden. Beide Stoffe sind insoweit verwandt, als sie die Blockierung der neuromuskulären Übertragung durch Verminderung des Endplattenpotentials (EPP) erreichen (Schaefer u. Haas 1939, Riker u. Wescoe 1951/52). Ihre bisher bekannte Hauptwirkung kann — wenn auch nur in grober Annäherung — als elektrische Stabilisierung der post-synaptischen Membran unter der Endplatte aufgefaßt werden, die so vor der depolarisierenden Wirkung des Überträgerstoffes geschützt wird (Fleckenstein, Eigler u. Bruch 1955). Demgegenüber geht die neuromuskuläre Lähmungswirkung der „depolarisierenden" Relaxantien zumindest anfänglich mit einer Dauerdepolarisation der Endplattenregion einher (vgl. Thesleff 1955, 1956). Es waren daher für die „stabilisierenden" Substanzen von vornherein auch andere Wirkungen an den Muskelspindeln zu erwarten. Folgende Fragen sollten besonders geklärt werden:

1. Lassen sich lähmende oder aktivierende Einflüsse von Curarin und Flaxedil auf den sensorischen Anteil des Receptors nachweisen?

2. Ist die Stabilisierung der intrafusalen Endplattenregion mit flüchtigen präparalytischen Erregungen der Intrafusalmuskulatur verbunden, die sich — ähnlich wie bei Succinylcholin und Decamethonium — in vorwiegend salvenförmigen Entladungen der Spindeln äußern müßten?

3. Werden die Endplatten der intrafusalen Muskelfasern gleichzeitig, früher oder später als die der extrafusalen Muskulatur gelähmt?

Methodik

Wir arbeiteten an über 50 Froschpräparaten, meist größeren Temporarien mit etwa 50 g Körpergewicht. Die von uns für den Frosch modifizierte Methodik von Granit zur elektrophysiologischen Registrierung der Entladung einzelner Muskelspindeln wurde andernorts ausführlich beschrieben (Henatsch u. Schulte 1958), so daß hier stichwortartige Hinweise genügen.

Totale Denervierung der zu untersuchenden Hinterextremität bis auf die Nervenäste zum Gastrocnemius. Mobilisierung dieses Muskels bis zum Ansatz und Befestigung wahlweise an isotonischem oder isometrischem Hebel, dessen Ausschläge auf dem zweiten Strahl des Doppelstrahloscillographen angezeigt wurden. Freilegung des Rückenmarkes und zentrale Durchschneidung der IX. Hinterwurzel. Aufteilung dieser Wurzel in feine Filamente. Ableitung von einem geeigneten Filament über einen Tektronix-Vorverstärker (Type 123) und Oscillographen-Hauptverstärker. Aufzeichnung der Aktionspotentiale auf dem 1. Strahl des Kathodenstrahloscillographen. Bei stillgelegtem Kippgerät wurden die Ausschläge auf

einem Kymographen bei verschiedenen Geschwindigkeiten auf Fotopapier registriert. Beobachtung auf einem parallel geschalteten Sichtoscillographen. Kanülierung der Vena cutanea magna. Die zu untersuchenden Pharmaka[1] gaben wir teilweise i.v., teilweise in ein den M. gastrocnemius umgebendes Ringer-Bad. Der Muskel konnte sowohl mit verschiedenen, definierten Kräften gedehnt als auch über seinen Nerven am Ischiadicus-Stamm mit einzelnen Kondensatorentladungen aus einem Reizgerät gereizt werden. Die Durchgängigkeit efferenter Reize war für die extrafusale Muskulatur an ihren mechanischen Kontraktionen, für die intrafusale Spindelmuskulatur an afferenten Entladungssalven der abgeleiteten Spindel zu erkennen.

Ergebnisse

d-Tubocurarin. „Curarin-Asta" gaben wir entweder in Konzentrationen von 0,12—0,33 mg/ml in das Muskelbad oder bis zu 1 mg i.v. Wie zu erwarten, setzten bei dieser Dosierung nach einiger Zeit Blockierungen der neuromuskulären Übertragung auf die extrafusale wie auch auf die intrafusale Muskulatur ein. Fast immer waren die extrafusalen Muskelfasern etwas eher gelähmt als die Binnenmuskeln der Spindeln, ein Befund, der schon von Katz (1949) erhoben wurde. Der zeitliche Unterschied bis zum Eintritt der Lähmung in den beiden motorischen Systemen war bei beiden Applikationsformen mit 3 bis höchstens 5 min nicht sehr groß. Die Dauer dieses Intervalles verkürzte sich im allgemeinen mit höherer Dosierung, war aber auch bei der übermaximalen Dosis von 1 mg i.v. noch zu beobachten, wie in Abb. 1 (S. 250) gezeigt ist: Wenige Minuten nach Ende der Curare-Infusion (Dauer etwa 1 min) war die extrafusale Lähmung bereits weit fortgeschritten, wenn auch noch unvollständig. Infolge des unzureichenden Entlastungseffektes der geringen extrafusalen Restkontraktion fehlte in diesem Stadium die sonst charakteristische initiale „Pause" in der vom Reiz bewirkten Entladungssalve der Spindel (vgl. Kontrollregistrierung). Noch nach 7 min führte jeder efferente Nervenreiz zu deutlicher Kontraktion der intrafusalen Muskulatur, wie die voll erhaltene Entladungssalve der großen Spindelimpulse beweist. Dagegen war zu diesem Zeitpunkt die neuromuskuläre Überleitung auf die extrafusalen Fasern bereits völlig unterbrochen, das sehr empfindliche isometrische Myogramm zeigte keinen Ausschlag mehr. — Etwa $^2/_3$ all unserer Versuche mit Curare hatten diese Ergebnisse.

In den restlichen Fällen konnten wir beobachten, daß Spindelbinnenfasern und extrafusale Muskulatur praktisch gleichzeitig gelähmt waren. Nur ausnahmsweise erlosch die Kontraktilität der intrafusalen Fasern einmal eher als die der extrafusalen. Eine solche Ausnahme ist in Abb. 1 mit wiedergegeben. Hier wurden nämlich in demselben Hinterwurzelfilament die fortgeleiteten Aktionspotentiale einer 2. Spindel, mit

[1] d-Tubocurarin erhielten wir von den Asta-Werken, Brackwede (Curarin-Asta), Flaxedil von der Firma E. Boehringer, Ingelheim. Beiden Firmen danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

deutlich geringerer Amplitude, zufällig mitregistriert. Die in der Kontrollregistrierung deutliche Salve von Entladungen dieses zweiten Receptors nach Nervenreiz war schon 3 min nach der Curare-Applikation vollständig erloschen; die efferente Innervation war also an seinen intrafusalen Endplatten schon zu einem Zeitpunkt unterbrochen, in dem sich der Muskel nach indirektem Reiz noch geringfügig extrafusal kontrahierte.

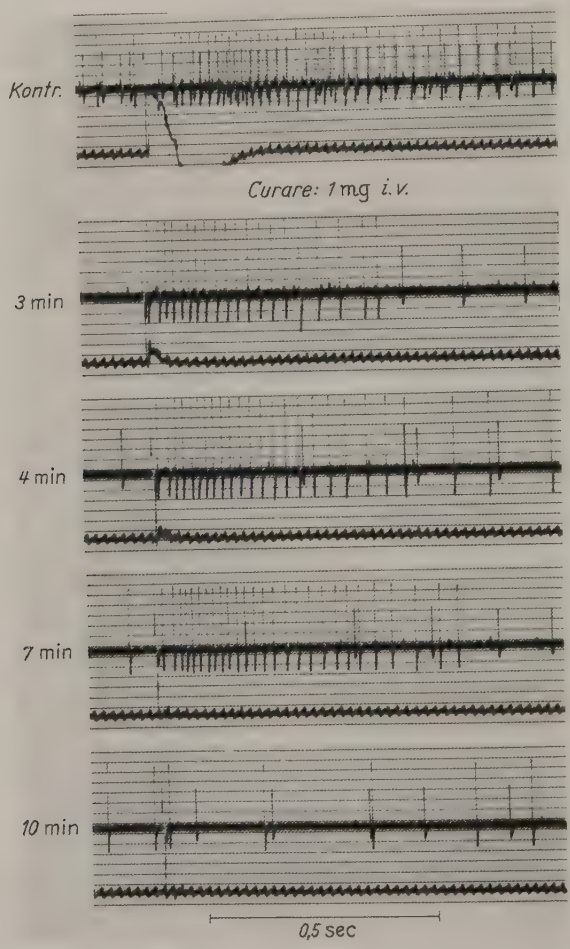


Abb. 1. *Latenzunterschiede der extrafusalen und intrafusalen Endplatten-Blockierung nach Curare.* Frosch, linke Hinterextremität denerviert außer M. gastrocnemius. Übermaximale Einzelreize am Nervenstamm. *Oberer Strahl:* Afferente Impulse von 2 Gastrocnemius-Muskelspindeln (große und kleine spike-Amplituden), ausgelöst durch Kontraktion der Intrafusal-Muskulatur. *Unterer Strahl:* Extrafusale Kontraktion des Gesamtmuskels (semi-isometrische, differenzierende Registrierung), mit überlagertem Netzbrumm (50 Hz). Nach der Kontrollregistrierung (beachte die Entladungspause der Spindeln während des Kontraktions-Anstieges): 1 mg d-Tubocurarin i.v. Zeiten neben den weiteren Kurven vom Ende der Injektion gerechnet. — An den großen spikes noch nach 7 min deutliche intrafusale Salve. Intrafusale Antwort des anderen Receptors und extrafusale Kontraktion schon mehrere Minuten früher erloschen

Nach Curare sahen wir nie jene kontinuierlichen oder salvenförmigen Steigerungen der sensorischen Entladungsfrequenz, wie sie z. B. nach Succinylcholin typisch sind (Granit, Skoglund u. Thesleff 1953; Henatsch u. Schulte 1958). Die Spontanaktivität blieb praktisch immer unbeeinflußt. Die Dehnungsempfindlichkeit des Spindelreceptors war unter Curare-Einwirkung manchmal anfänglich mäßig gesteigert, um bei sehr hoher und langanhaltender Dosierung regelmäßig später fortschreitend abzunehmen (Abb. 2). Bei geringerer, jedoch für extra- und intrafusale Lähmung voll ausreichender Curare-Dosis hielt sie sich oft

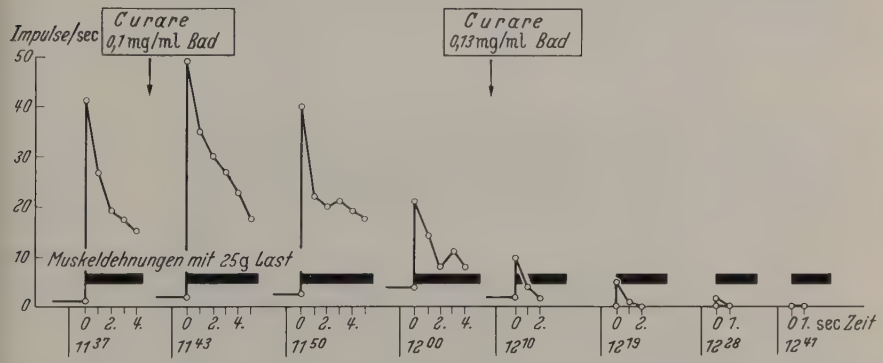


Abb. 2. *Späte Abnahme der Dehnungsempfindlichkeit einer Gastrocnemius-Muskelspindel nach hoher und langdauernder Curarisierung.* Muskel in Ringer-Lösung (80 ml). Dauerbelastung 30 g. Spontanaktivität der Spindel schwankend zwischen 2—5 Imp./sec. 2malige Gabe hoher Dosen von d-Tubocurarin in das Muskelbad (Intervall etwa 25 min). Zu den angegebenen Zeiten Dehnungsproben durch plötzliche Zusatz-Last von 25 g (schwarze Balken). *Abszissen:* jeweils 1.—5. sec nach Dehnungsbeginn. *Ordinaten:* Spindel-Impulse/sec während der Dehnungen. Kurz nach der 1. Curare-Dosis leichte Steigerung der Dehnungsempfindlichkeit; später fortschreitender Abfall bis auf Null

stundenlang auf kaum veränderter Höhe. Die in diesen Fällen voll erhaltene Erregbarkeit des sensorischen Receptor-Endorgans wird auch dadurch belegt, daß Succinylcholingabe nach extra- und intrafusaler Curare-Lähmung noch starke Entladungssteigerungen der Spindeln erzeugte (Henatsch u. Schulte 1958).

Flaxedil. Flaxedil gaben wir meist i.v. (6—16 mg), seltener in das Muskelbad (bis zu 2 mg/ml) oder noch seltener vor Versuchsbeginn in den Rückenlymphsack (2 mg).

Bei i.v. Applikation der genannten hohen Dosen war die extrafusale Muskulatur des Frosches fast sofort gelähmt. Die neuromuskuläre Überleitung auf die intrafusalen Muskelfasern war dagegen häufig nur schwer, in einigen Fällen mit den angegebenen Dosen überhaupt nicht zu unterbrechen. Der Unterschied in der extra- und intrafusalen Lähmbarkeit war in fast allen Versuchen wesentlich eindrucksvoller als bei Curare. In Abb. 3 sieht man, daß die Spindelbinnenfasern noch 24 min nach der

i.v. Flaxedil-Gabe und 23 min nach totaler extrafusaler Lähmung jeden Nervenreiz mit Kontraktion beantworteten, wiederum sichtbar an der Entladungssalve des sensiblen Receptors. Die einzelnen Salven hatten zwar deutlich abgenommen, blieben aber mit wechselnder Länge grundsätzlich erhalten. Erst anschließend gaben wir in diesem Versuch 1 mg Curare i.v., wodurch die Überleitung an den intrafusalen Endplatten

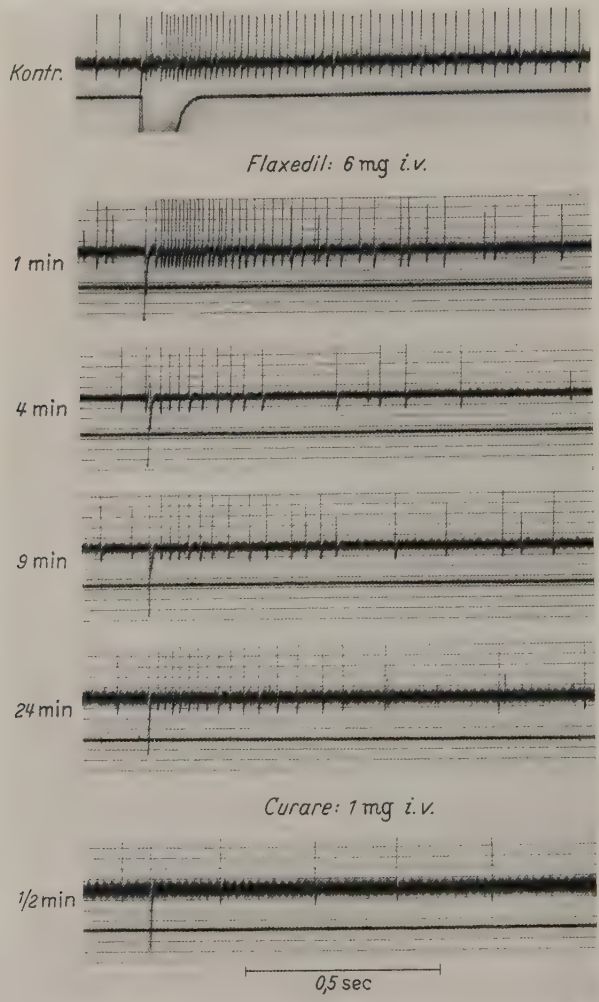


Abb. 3. *Lange fortbestehende intrafusale Aktivierbarkeit einer Muskelspindel nach Flaxedil.* Kurvenbedeutung und Technik wie in Abb. 1. Die rein isometrische (hier nach abwärts geschriebene) Kontraktion bewirkt nur eine angedeutete initiale „Spindel-Pause" (siehe *Kontr.*). Die extrafusale Kontraktion ist bereits nach weniger als 1 min erloschen. Die intrafusalen Spindel-Salven sind nach 24 min zwar vermindert, aber noch deutlich erhalten; sie verschwinden erst nach anschließender Curare-Gabe

augenblicklich unterbrochen wurde. Trotz der absichtlich extrem hohen i.v. Dosierung von Flaxedil lagen zwischen der totalen Lähmung der extrafusalen und derjenigen der intrafusalen Endplatten in 8 Versuchen Zeiten von mehr als 15 min, im Einzelfall bis zu 45 min. In zwei Fällen mit extrem langem Intervall haben wir die Zeiten noch dadurch abgekürzt, daß wir wie in dem gezeigten Beispiel die endgültige intrafusale Lähmung durch Curare i.v. erzwangen; wir vergewisserten uns dadurch, daß der Kreislauf des Tieres auch in diesem Spätstadium des Versuches bis in den mobilisierten Gastrocnemius intakt war, so daß die injizierten Pharmaka tatsächlich diesen Muskel und seine Spindeln erreichten.

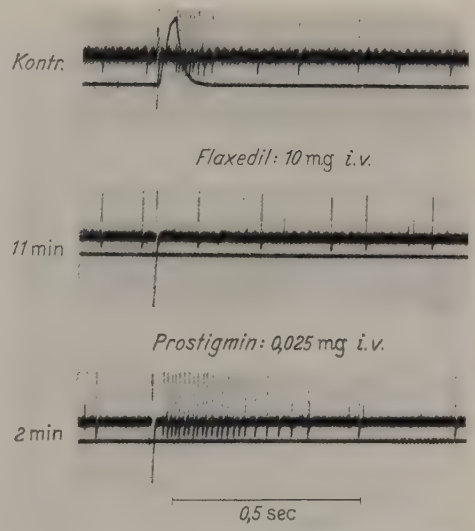


Abb. 4. *Isolierte Aufhebung der durch Flaxedil bewirkten intrafusalen Lähmung durch Prostigmin.* Kurvenbedeutung und Technik wie in Abb. 1. Isotonische Kontraktion. 11 min nach hoher Flaxedil-Dosis i.v. sind sowohl extrafusale als auch intrafusale Kontraktilität nach Nervenreiz erloschen. 2 min nach Prostigmingabe i.v. erscheint wieder eine (verstärkte) intrafusale Spindel-Salve, während die extrafusale Muskulatur gelähmt bleibt

Nicht alle Spindeln verhielten sich gleichartig resistent gegenüber Flaxedil. In drei unserer Versuche mit i.v. Applikation waren die intrafusalen Fasern praktisch gleichzeitig mit der übrigen Muskulatur gelähmt. Diese Spindeln bildeten aber seltene Ausnahmen, die zudem bei anderer als i.v. Zufuhr überhaupt nicht beobachtet wurden. So vergingen bei Gabe hoher Flaxedil-Dosen in das Muskelbad in 4 Versuchen nach extrafusalem neuromuskulärem Block, der selbst schon erheblich später als nach i.v. Injektion erfolgte, stets mehr als 10 weitere Minuten bis zum Erlöschen der intrafusalen Salven nach Nervenreiz. Bei zwei dieser Spindeln konnten wir mit Konzentrationen von Flaxedil bis zu 2 mg/ml im Bad gar keine völlige Lähmung der Spindelbinnenmuskulatur erreichen. Auch hier ließ sich nach langer Beobachtungszeit die verbliebene synaptische Überleitung sofort durch Curare oder auch durch Succinyl unterbrechen.

War die Endplattenlähmung beider Systeme nach Flaxedil einmal vollständig, so konnten wir mit Prostigmin die neuromuskuläre Überleitung an den intrafusalen Fasern wesentlich leichter und schneller als an der extrafusalen Muskulatur wiederherstellen. Dies geht aus Abb. 4 hervor, in der kurz nach Prostigmingabe die vorher verschwundene

Salvenantwort der Spindel bei efferentem Reiz wieder erscheint, die Muskelkontraktion aber noch ausbleibt.

Am Gastrocnemius des Frosches fanden wir bei partieller Lähmung mit Flaxedil immer ausgeprägter als bei Curare ein Stadium, in dem nur noch der erste von mehreren Nervenreizen, die in Abständen von etwa 2 sec aufeinanderfolgten, mit einer extrafusalen Kontraktion beantwortet wurde. Hielten wir dann die Reizpause genügend lang (3—5 min), so

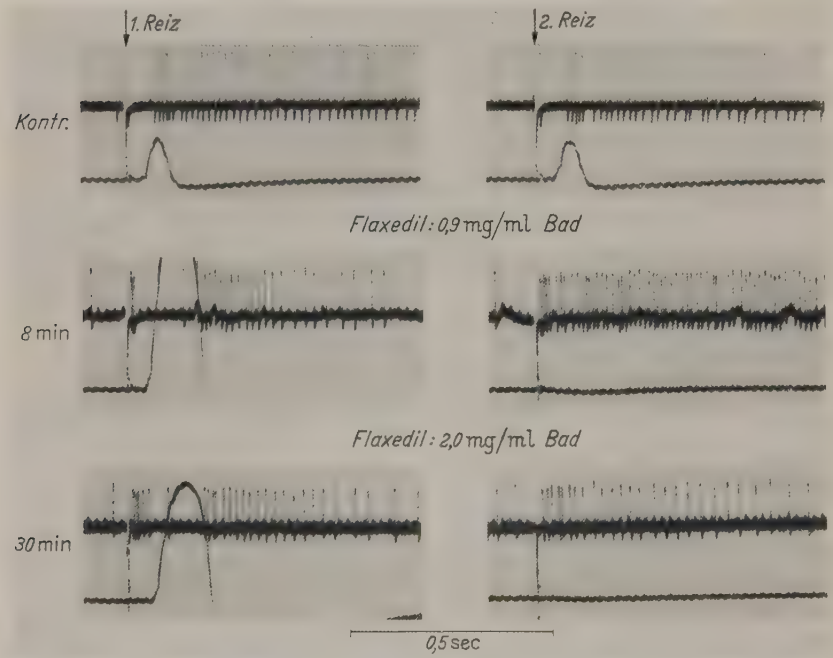


Abb. 5. *Partielle Flaxedil-Lähmung mit verstärktem extrafusalem Wedensky-Effekt und voll erhaltener intrafusaler Aktivierbarkeit.* Kurvenbedeutung und Technik wie in Abb. 1. Isotonische Kontraktionen. 2malige Gabe von Flaxedil in das Muskelbad. In jeder Horizontalreihe sind die ersten 2 Reizantworten einer kurzen Serie von Einzelreizen (Intervalle knapp 2 sec) wiedergegeben (Zwischenstücke ausgeschnitten). Der jeweils 1. Reiz erzeugt eine überhöhte extrafusale Kontraktion; der 2. Reiz wird extrafusal nicht, intrafusal aber stark beantwortet

gelang es bei vorsichtiger Dosierung, besonders mit Applikation des Flaxedil in das Muskelbad, häufig über Stunden nicht, die Endplatten auch für den ersten Reiz einer Serie mit der Frequenz von ½ Hz zu lähmen.

In dem in Abb. 5 dargestellten Versuch betrug die Konzentration von Flaxedil im Muskelbad zunächst 0,9, später 2 mg/ml. Noch nach 30 min wurde jeweils der erste Probereiz von der extrafusalen Muskulatur, und zwar stärker als bei der Kontrolle vor Flaxedil, beantwortet. Die Intrafusalfasern wurden dabei noch durch jeden Reiz aktiviert. Dieser Zustand blieb bis zum Versuchsende bestehen.

Bei einem anderen Frosch dagegen (Abb. 6) war nach 6 mg Flaxedil i.v. die Arbeitsmuskulatur sofort gelähmt. Die Intrafusalfasern wurden nach 11 min nur noch jeweils vom ersten Reiz einer Serie erregt, waren aber für alle weiteren in Abständen von 2 sec folgenden Kondensatorentladungen gelähmt. Eine Minute später war jegliche efferente Erregungsübertragung aufgehoben.

Nach i.v. Zufuhr von Flaxedil sahen wir immer an der gesamten Skeletmuskulatur zunächst deutliche Fibrillationen und Fasciculationen,

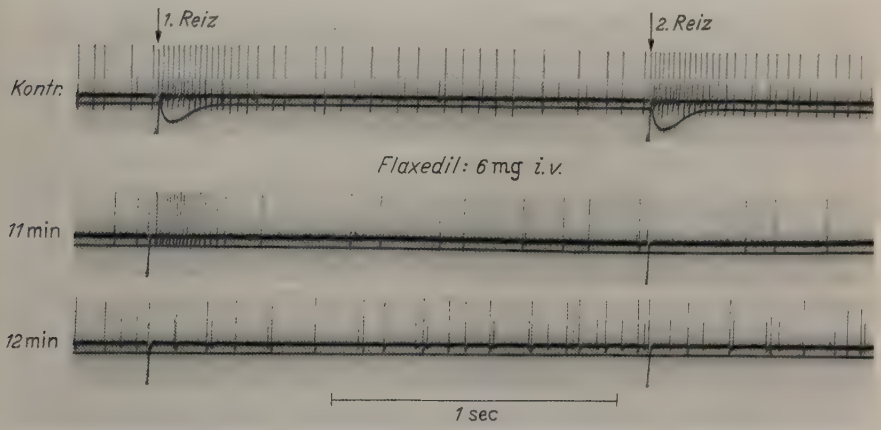


Abb. 6. *Flüchtiger intrafusaler Wedensky-Effekt vor vollständiger Flaxedil-Lähmung.* Kurvenbedeutung wie bisher, Technik wie in Abb. 5. Isometrische Kontraktionen nach abwärts geschrieben. Antworten auf die jeweils ersten 2 Schocks kurzer Reizserien. Rasche, komplette extrafusale Lähmung nach hoher Flaxedil-Dosis i.v. Nach 11 min bewirkt nur noch der 1. Reiz eine intrafusale Spindel-Salve; 1 min später bleiben alle Reize unbeantwortet

deren größere von flüchtigen Entladungssalven der Spindeln begleitet waren. Nicht selten eilten dabei die afferenten Impulssteigerungen der Spindel den mitregistrierten extrafusalen Kontraktionsbewegungen des Gastrocnemius voraus (vgl. Schulte u. Henatsch 1958). Diese Aktivitäten verschwanden meistens nach Deefferentierung. Allerdings traten auch am deefferentierten Präparat nach Flaxedil gelegentlich flüchtige, salvenförmige Erregungen der Muskelspindeln auf, ohne daß deutliche zugeordnete, äußere Muskelkontraktionen erkennbar waren. Sie ließen sich in solchen Fällen häufig durch Schockreizung des Muskelnerven provozieren, konnten dann aber als unregelmäßige Repetierungen unabhängig weiter erscheinen, wie in Abb. 7 an zwei Spindeln gezeigt ist.

Bei erhaltener efferenter Innervation haben wir nach Flaxedil mehrfach — wenn auch keineswegs regelmäßig — einen eigentümlich stetigen „Aufschaukel-Effekt" langsam aufeinanderfolgender Nervenreize (Intervalle wieder etwa 1,5—2 sec) auf die Spindeln beobachtet: Die repetierten intrafusalen Spindelsalven nahmen von Reiz zu Reiz an Frequenz und

Dauer zu, füllten bald das ganze Reizintervall aus und gingen schließlich nach 5—8 Reizen in eine hochfrequente Dauerentladung des Receptors über. In Abb. 8 ist ein solcher Fall graphisch wiedergegeben. Die Auszählung der Spindelimpulse von Reiz zu Reiz ergibt hier ein überraschend gleichmäßiges Anwachsen der Entladungsfrequenz innerhalb der 8 Perioden dieser Reizserie und darüber hinaus.

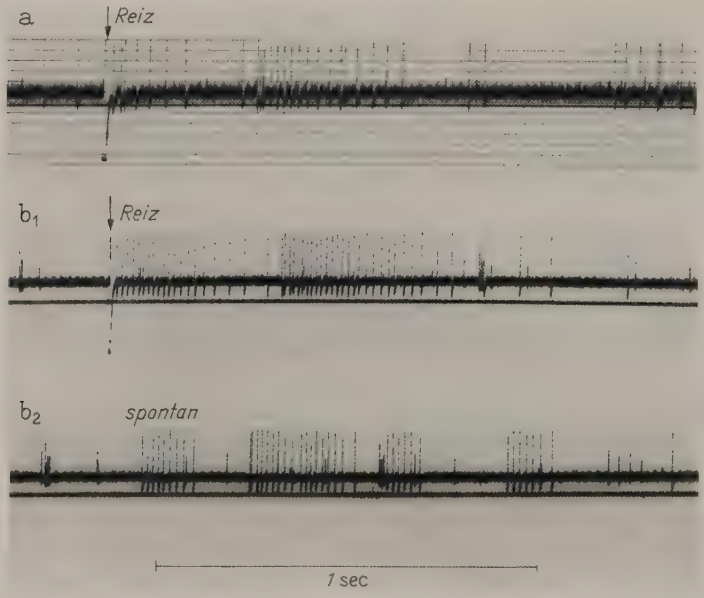


Abb. 7. *Repetierte intrafusale Salven im präparalytischen Stadium nach Flaxedil.* Kurven *a* und *b* von 2 verschiedenen Gastrocnemius-Spindel-Präparaten. Beide nach Flaxedil extrafusal völlig gelähmt, jedoch intrafusal noch aktivierbar. *a* und b_1: Einzel-Nervenreize bewirken repetierte intrafusale Spindel-Salven; b_2 gleiche Spindel wie b_1, kurze Zeit später „spontane" Salven produzierend

Wurden die extra- und intrafusalen Endplatten vor der Flaxedil-Applikation sicher mit Curare gelähmt, so haben wir nie eine der beschriebenen Erscheinungsformen von Receptoraktivität gesehen.

Besprechung der Ergebnisse

Wie an anderen Substraten, so haben unsere Versuche auch an den Muskelspindeln gewisse Gemeinsamkeiten im Wirkungscharakter von Curare und Flaxedil erbracht. Für beide trifft zunächst eine negative Feststellung zu: es fehlen ihnen sichere direkte Erregungswirkungen auf die sensorischen Endorgane der Spindeln. In dieser Beziehung stehen sie in deutlichem Gegensatz zu den depolarisierenden Relaxantien Succinylcholin und Decamethonium, die jene in sehr charakteristischer Weise direkt chemisch erregen. Völlig eindeutig läßt sich jeder Erregungseffekt für Curare verneinen; wenn es bei hoher und langdauernder Dosierung

überhaupt auf die sensorischen Eigenschaften der Spindeln einwirkte, dann nur unspezifisch deprimierend (Abnahme der Dehnungsempfindlichkeit im Spätstadium). Die bisweilen anfänglich wenig gesteigerte Dehnungsempfindlichkeit, bei gleichbleibender Spontanaktivität, ist als indirekte, passive Folge der allgemeinen „lissiven" Wirkung dieser Substanz (vgl. Bremer, Titeca u. Vandermeiren 1927; Erdmann u. Schmidt 1956) auf die Muskulatur zu verstehen: da die Muskelspindeln nicht (wie die Sehnenreceptoren) eigentliche „Spannungsfühler", sondern Meßaufnehmer für Längenänderungen des Muskels darstellen (Granit 1955), kann die bei gleicher Dehnungskraft stärkere Längenzunahme des curarisierten Muskels den adäquaten Reiz für die Spindeln intensivieren.

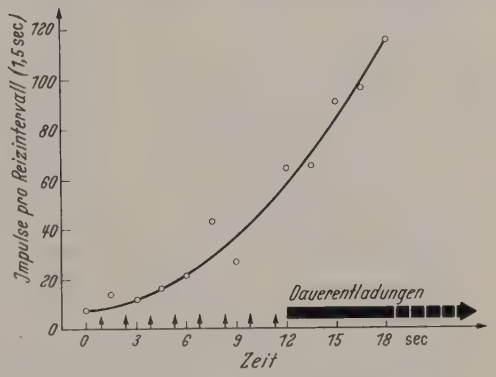


Abb. 8. *„Aufschaukel-Effekt" repetierter Einzelreize mit nachfolgenden Dauerentladungen einer Spindel bei partieller (extrafusaler) Flaxedil-Lähmung. Abszisse:* Zeit in Sekunden Eine Serie von 8 auf-einanderfolgenden Einzelreizen am Nerven (Intervalle je 1,5 sec) ist durch vertikale Pfeile markiert. *Ordinaten:* Spindel-Impulse pro Reizintervall bzw. (vor und nach der Reizserie) pro entsprechenden Zeiten. Die von Reiz zu Reiz wachsenden Salven-Antworten füllen etwa ab 6. Reiz das ganze Intervall aus und gehen in Dauerentladungen über, die über die Reizserie hinaus mit wachsender Frequenz fortbestehen. Ende der Entladungen nicht abgewartet, Registrierung nur bis zur unterbrochenen Strecke des Horizontalpfeiles

Der Ausschluß sensorischer Wirkungen könnte für Flaxedil auf den ersten Blick schwerer fallen, da bei ihm nach i.v. Gabe häufig unregelmäßige, wenn auch nicht sehr ausgeprägte Vermehrungen der afferenten Spindelentladungen auftraten. Diese im ganzen recht uneinheitlichen Effekte können aber besser auf indirekte Wirkungen über die neuromuskulären Systeme der Intrafusalmuskulatur zurückgeführt werden (siehe unten). Sie allein berechtigen jedenfalls nicht zu der Annahme, daß Flaxedil den sensorischen Anteil des Receptors erregend oder hemmend beeinflußt.

Qualitativ gleichartig trat auch bei beiden Substanzen hervor, daß die Intrafusalmuskulatur gegenüber der Masse der extrafusalen Skelet-muskulatur schwerer endgültig zu lähmen war. Quantitativ ergaben sich aber in diesem Punkt bemerkenswerte Unterschiede. Für Curare bedeuten unsere Befunde zunächst lediglich eine Bestätigung früherer Feststellungen von Katz (1949). Entsprechende Beobachtungen am Warmblüter haben Granit u. Mitarb. (1953) gemacht. Es sei darauf hingewiesen, daß auch bei unseren oft absichtlich extrem hohen Curare-Dosierungen dieses Phänomen in vielen Fällen noch deutlich hervortrat. Ganz ungewöhnlich ausgeprägt war die stärkere Resistenz der Spindelbinnenfasern beim Flaxedil. Bei i.v. Injektion einer Dosis, welche die Überleitung

an den extrafusalen Endplatten stets fast augenblicklich unterbrach, streuten die Zeiten bis zur vollständigen intrafusalen Lähmung bis zu 45 min nach der Injektion; bei peripherer Applikation von Flaxedil gelang sie mehrfach über Stunden überhaupt nicht.

Abgestufte Flaxedil-Gabe bietet also am Kaltblüter eine fast spezifische Möglichkeit, um die extrafusale Muskulatur für längere Zeit funktionell auszuschalten, während die Spindelbinnenmuskulatur zumindest teilweise nervös aktivierbar bleibt. Sollte sich dieser Befund auch am Warmblüter bestätigen, wofür quantitative Untersuchungen noch ausstehen, so käme ihm auch praktische Bedeutung zu[1]. Man könnte damit bei motorischen Innervationsakten erreichen, daß die proprioceptiven Rückmeldungen und ihre zentralen Wirkungen bis zu gewissem Grade ungestört von komplizierenden mechanischen Kontraktionseffekten der Arbeitsmuskulatur erhalten bleiben.

Neuere Untersuchungen von Koketsu u. Nishi (1957) sowie von Eyzaguirre (1957) haben ergeben, daß sich die intrafusalen Fasern des Kaltblüters von seiner extrafusalen Muskulatur, insbesondere von seinen „twitch fibers" (vgl. Kuffler 1953), durch stärkere multiple Innervation und abweichendes elektrophysiologisches Verhalten unterscheiden. Vor allem sind ihre „junctional potentials" (intrafusale EPP) stärker resistent gegenüber tetanischer Reizung, d. h. sie zeigen weniger ausgeprägte Wedensky-Hemmung. Nun haben schon frühere Untersuchungen gezeigt, daß der Wedensky-Hemmung einerseits und der Curare- oder Flaxedil-Lähmung andererseits ganz analoge Vorgänge zugrunde liegen, nämlich Verminderungen der EPP (Schaefer u. Haas 1939; Riker u. Wescoe 1951/52). Wenn diese Verminderungen nach Koketsu u. Nishi bei rhythmischer Reizung an den intrafusalen neuromuskulären Synapsen geringer sind, dann dürften auch für Curare und noch mehr für Flaxedil entsprechende Unterschiede an beiden neuromuskulären Systemen anzunehmen sein: bei gleicher Einwirkung sollten die intrafusalen „junctional potentials" geringer als die EPP der extrafusalen Muskulatur abnehmen. Damit wird der spätere Verlust ihrer Übertragungspotenz auf die Spindelmuskulatur verständlich.

In diese Vorstellung fügt sich auch unsere — wiederum besonders für Flaxedil geltende — Beobachtung ein, daß bei Teillähmung der intrafusalen Fasern in einem gewissen Stadium der erste Reiz einer Schockserie von 20—30 Impulsen/min noch mit Kontraktion (und entsprechender afferenter Spindelsalve) beantwortet wurde, die nachfolgenden aber nicht mehr (Abb. 6). Für die übrige Skeletmuskulatur ist dieser Effekt unter Curareeinwirkung schon seit Böhm (1895) bekannt. Wahrscheinlich

[1] *Nachtrag bei der Korrektur.* Granit hat kürzlich in unveröffentlichten Versuchen beobachtet, daß auch an der Intrafusalmuskulatur von Katzen- und Kaninchen-Muskelspindeln die neuromuskuläre Übertragung der efferenten „Gamma"-Innervation gegenüber Flaxedil hochgradig resistent ist (persönl. Mitteilung).

summieren sich hier synergistisch die Wirkungen der rhythmisch wiederholten Reizungen und der fortschreitenden neuromuskulären Lähmung durch das stabilisierende Relaxans, die beide zu allmählicher Abnahme der EPP führen. Nach hinreichender Zeit werden dann schon so niedrige Reizfrequenzen, wie wir sie in der Regel verwendeten (Reizintervalle von 2—3 sec), genügen, um die Entstehung weiterer EPP völlig zu verhindern; d. h. die sonst erst bei höherer Frequenz eintretende Wedensky-Hemmung manifestiert sich jetzt schon bei relativ langsam wiederholten Einzelreizen.

In den Versuchen mit Flaxedil fielen einige weitere Besonderheiten auf. Nach i.v. Zufuhr beobachteten wir flüchtige und unregelmäßige Entladungssalven der Spindeln, eingestreut in die im übrigen unveränderte Spontanaktivität; sie waren allerdings keinesfalls mit den massiven, langdauernden Spindelerregungen nach Succinylcholin (Henatsch u. Schulte 1958) zu vergleichen. Soweit sie an Präparaten mit erhaltenem Zentralnervensystem nach Deefferentierung (Durchtrennung der Vorderwurzeln für die Hinterextremität) verschwanden, können sie durch unspezifische, kompensatorisch gesteigerte Innervationsstöße auf die extra- und intrafusale Muskulatur entstanden sein, mit denen der Organismus die beginnende, sensorisch empfundene Lähmung zu überwinden suchte. Die spät einsetzende intrafusale Endplatten-Blockierung macht verständlich, daß solche zentralen Antriebe sich noch längere Zeit am Entladungsmuster der Spindeln auswirken können.

Diese Deutung scheidet aber für jene relativ häufigen Fälle aus, in denen auch nach Deefferentierung eine deutliche Unruhe der Spindelentladungen, mit kommenden und gehenden kurzen Impulsausbrüchen, fortbestand. Mehrfach entwickelte sich dieses Stadium nur zögernd nach der Flaxedil-Zufuhr, hielt sich dann aber über ähnlich lange Zeiträume wie die Latenz bis zur völligen Lähmung der Intrafusalsysteme. — Es ist nicht zu leugnen, daß Flaxedil das Wirkungsbild einer lediglich „stabilisierenden" Substanz erst im Endeffekt erreicht, vorübergehend aber, anders als Curare, in der präparalytischen Phase Eigenschaften entwickelt, die es in die Nähe der depolarisierenden Relaxantien rücken (Fleckenstein u. Mitarb. 1955). Auch Riker u. Wescoe (1951/52) haben kurze präparalytische Erregungsphasen von Flaxedil am Froschmuskel beschrieben — ein Befund, der allerdings von anderen Autoren nicht gesehen worden ist (Steinke u. Vogel 1954).

Wir nehmen daher an, daß die geschilderten Receptorsalven durch schwache präparalytische Erregungswirkungen auf die Endplatten der Binnenfasern zustandekommen, die diese zu unregelmäßigen Kontraktionen veranlassen. Diese Interpretation wird u. a. besonders durch 2 Befunde gestützt: 1. nach vorausgehender völliger Curarisierung der Endplatten haben wir nie mehr die beschriebene Receptorsalven gesehen.

2. Nach Flaxedil beobachteten wir fast regelmäßig zunächst mehrfache Repetierungen der bekannten Entladungssalve nach elektrischem Nervenreiz. Sie deuten auf eine präparalytische Sensibilisierung der intrafusalen Endplatten hin. In diesem Stadium veranlassen die Endplatten bei einmaligem Reizanstoß mehrfache tetanische oder tonische Kontraktionen der Intrafusalfasern. Bei vorsichtiger Dosierung demonstriert sich die anfänglich gesteigerte Endplattendurchgängigkeit auch an der extrafusalen Muskulatur, indem die Nervenreize zunächst durch stärkere Kontraktionen des Gesamtmuskels beantwortet werden (Abb. 5).

An dem gelegentlich beobachteten „Aufschaukeleffekt" mehrfach wiederholter efferenter Reize auf die Spindelentladungen können sowohl zentrale als auch periphere Faktoren beteiligt sein. Mehrere unabhängige Untersuchungen (Katz 1949; Eyzaguirre 1957; Schulte u. Henatsch 1958) haben nachgewiesen, daß die Spindelbinnenmuskulatur des Kaltblüters im Gegensatz zum Warmblüter vorwiegend von dicken, efferenten Fasern der A-Alpha-Gruppe motorisch innerviert wird; sehr wahrscheinlich ziehen Verzweigungen der gleichen Faserstämme sowohl zur intrafusalen als auch zur extrafusalen Muskulatur. Wenn in Analogie zum Warmblüter die proprioceptiven Impulse von den Spindeln erregende Antriebe für die motorischen Vorderhornzellen (Alpha-Motoneurone) liefern, dann ist dadurch die Möglichkeit gegeben, daß die Receptorentladungen auch diejenigen Motoneurone aktivieren, welche ihre eigene Binnenmuskulatur efferent versorgen. Wir hätten hier eine „positive Rückkoppelung" vor uns, die eine typische Aufschaukelwirkung haben müßte. Solange sich zusammen mit den intrafusalen Fasern die über die gleichen Nerven gereizte, kräftigere extrafusale Muskulatur verkürzt, wird der für die Spindeln typische Entlastungseffekt die afferenten Salven abstoppen und so den Rückkoppelungsmechanismus unterbrechen. Ist aber die extrafusale Muskulatur ganz oder teilweise isoliert gelähmt, wie es für Flaxedil typisch ist, dann können die Receptorentladungen, ungehemmt durch die Verkürzungspause, von Reiz zu Reiz weiter ansteigen.

Für diese Deutung spricht, daß sowohl nach Deefferentierung als auch nach Deafferentierung niemals so typische Aufschaukeleffekte bei repetierter Reizung nach Art des in Abb. 8 gezeigten Beispiels (wohl aber teilweise noch Salvenwiederholungen, siehe oben) gefunden wurden. Daß wir sie überhaupt nur selten so charakteristisch sahen, kann daran liegen, daß wir — um ein geeignetes Filament mit Gastrocnemius-Spindelimpulsen zu finden — meist einen großen Teil der IX. Hinterwurzel durchschneiden mußten. Die Hauptmasse der für die positive Rückkoppelung notwendigen Afferenzwege aus dem Gastrocnemius war also vielfach von vornherein unterbrochen. Nur wenn genügend Restafferenzen auf unversehrten Bahnen erhalten waren, konnte ein Mechanismus auf dieser Basis stattfinden.

Die periphere Erregbarkeitssteigerung der intrafusalen Endplatten nach Flaxedil würde den beschriebenen Effekt verstärken. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß er vielleicht durch periphere Faktoren allein

zustande kommt, zumal die eigenreflektorische Erregungswirkung der Muskelspindel-Impulse auf die Vorderhornzellen des eigenen Muskels für Kaltblüter durchaus nicht in gleicher Weise wie für die Warmblüter endgültig gesichert ist (vgl. Jung 1953). Nach Eyzaguirre (1957) gehört ein Teil der Intrafusalfasern des Frosches dem sogenannten „slow fiber system" (Kuffler 1953) an, das durch tonische Kontraktilität und langdauernde Summationsfähigkeit ausgezeichnet ist. Möglicherweise wirkt sich die allgemeine präparalytische neuromuskuläre Erregbarkeitssteigerung nach Flaxedil bevorzugt an diesen intrafusalen Elementen so aus, daß wiederholte Einzelreizungen sie zu zunehmend tonischen, schließlich verschmelzenden Dauerverkürzungen bringen. Auch hierdurch können die wachsenden Entladungssteigerungen der Spindeln zustandekommen.

Als allgemeine Schlußfolgerung ergibt sich aus unseren Versuchen, daß auch die „stabilisierenden" Relaxantien in ihrem peripheren Wirkungsbild nicht voll erfaßt werden, wenn lediglich ihre neuromuskulären Einflüsse auf die extrafusale Muskulatur betrachtet werden. Es fehlen ihnen zwar die direkten sensorischen Effekte auf die Spindelreceptoren, welche die „depolarisierenden" Substanzen auszeichnen; auf dem Umweg über die neuromuskulären Intrafusalsysteme können aber auch sie das Verhalten dieser Receptoren charakteristisch verändern. Beide Gruppen von Relaxantien bewirken also auf verschiedene Weise wesentliche Modifizierungen der zentralwärts geleiteten proprioceptiven Meldungen, die mehr als bisher Beachtung verdienen.

Zusammenfassung

An einzelnen Muskelspindeln aus dem M. gastrocnemius des Frosches wurden die Wirkungen von d-Tubocurarin und Flaxedil auf die sensorischen und neuromuskulären Anteile des Receptors (sensible Endorgane und Intrafusalmuskulatur) elektrophysiologisch geprüft.

1. Beiden Substanzen fehlen bei intravenöser und peripherer Applikation spezifische Direktwirkungen auf die sensiblen Endorgane der Spindeln. Curare setzt bei hoher und langdauernder Dosierung erst im Spätstadium die Dehnungsempfindlichkeit und Spontanaktivität des Receptors fortschreitend herab.

2. Nach Curare erfolgt die Endplatten-Lähmung der intrafusalen Spindelmuskulatur nur mäßig, nach Flaxedil außerordentlich stark verzögert gegenüber derjenigen der extrafusalen Skeletmuskulatur. Bei Flaxedil-Dosen, die zu rascher extrafusaler Lähmung führen, kann die efferente Aktivierbarkeit der Spindeln über Stunden erhalten bleiben.

3. Vor der endgültigen intrafusalen Lähmung durch Flaxedil erscheinen häufig unregelmäßig verstreute Steigerungen der afferenten Spindel-Entladungen, repetierte Salven-Antworten auf efferente Einzelreize und bisweilen sich aufschaukelnde, längere Dauerentladungen des

Receptors. Die Effekte werden auf eine schwache präparalytische Erregbarkeitssteigerung der intrafusalen Endplatten zurückgeführt, durch die rhythmische oder tonische Kontraktionen der Spindel-Binnenmuskulatur ausgelöst werden. Bei erhaltener Afferenz und Efferenz ist die Mitwirkung unspezifischer zentraler Faktoren wahrscheinlich.

4. Curare läßt keine Zeichen einer präparalytischen Erregungsphase der Intrafusalmuskulatur erkennen und unterbindet entsprechende Effekte nachfolgender Flaxedil-Gaben.

Literatur

Barker, D.: The innervation of the muscle spindles. Quart. J. micr. Sci. **89**, 143 (1948).

Boehm, R.: Einige Beobachtungen über die Nervenendwirkung des Curarin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **35**, 16 (1895).

Bremer, F., J. Titeca et L. Vandermeiren: C. R. Soc. Biol. (Paris) **96**, 704 (1927); **97**, 895 (1927).

Eldred, E., B. Fujimori and T. Tokizane: Effects of muscle spindle discharge upon monosynaptic reflex as revealed by syncurine administration. Fed. Proc. **16**, 34 (Nr. 146) (1957).

Erdmann, W. D., u. G. Schmidt: Experimentelle Prüfung der muskelentspannenden Wirkung („lissive action") von curareartigen und narkotisierenden Substanzen. Z. Biol. **108**, 178 (1956).

Eyzyguirre, C.: Functional organisation of neuromuscular spindle in toad. J. Neurophysiol. **20**, 521 (1957).

Eyzaguirre, C., and J. D. Vial: Electrical activity of the intrafusal muscle fibres. Nature (Lond.) **178**, 317 (1956).

Fleckenstein, A., J. Eigler u. H. Bruch: Adsorbtionsversuche an der Kollodiummembran zur Differenzierung endplattenblockierender Pharmaka mit depolarisierender bzw. depolarisationshemmender Grundwirkung. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**. 483 (1955).

Granit, R.: Receptors and sensory perception. The aims, means and results of electrophysiological research on the process of reception. New Haven: Yale University Press 1955.

Granit, R., and B. Holmgren: Two pathways from brain stem to gamma ventral horn cells. Acta physiol. scand. **35**, 93 (1955).

Granit, R., St. Skoglund and S. Thesleff: Activation of muscle spindles by succinylcholine and decamethonium. The effects of curare. Acta physiol. scand. **28**, 134 (1953).

Gray, E. G.: The spindle and the extrafusal innervation of a frog muscle. Proc. roy. Soc. **B, 146**, 416 (1957).

Henatsch, H. D., u. D. H. Ingvar: Chlorpromazin und Spastizität. Eine experimentelle elektrophysiologische Untersuchung. Arch. f. Psychiatr. Z. Neur. **195**, 77 (1956).

Henatsch, H. D., u. F. J. Schulte: Das Verhalten der Muskelspindeln des Frosches unter dem Einfluß von Muskelrelaxantien. (Vortr. Tagg. Dtsch. Physiol. Ges. Münster 1957). Pflügers Arch. ges. Physiol. **266**, 88 (1957). — Wirkungsmechanismen von Acetylcholin und Succinylcholin auf die Muskelspindeln des Frosches. Pflügers Arch. ges. Physiol. **265**, 440 (1958).

Hunt, C. C.: Drug effects on mammalian small-nerve fibers. Fed. Proc. **11**, 75 (1952).

Jung, R.: Allgemeine Neurophysiologie: Die Tätigkeit des Nervensystems. (Handbuch d. Inn. Med. 4. Aufl. Bd. V/1.) Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1953.

Katz, B.: The efferent regulation of the muscle spindle in the frog. J. exp. Biol. **26**, 201 (1949).

Koketsu, K., and S. Nishi: Action potentials of single intrafusal muscle fibers of frogs. J. Physiol. (Lond.) **137**, 193 (1957).

Kuffler, St. W.: The two scelectal nerve-muscle systems in frog. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **220**, 116 (1953).

Riker, W. F., and W. C. Wescoe: The pharmacology of Flaxedil with observations on certain analogs. Ann. New York Acad. Sci. **54**, 373 (1951/52).

Schaefer, H., u. P. Haas: Über einen lokalen Erregungsstrom an der motorischen Endplatte. Pflügers Arch. ges. Physiol. **242**, 364 (1939).

Schulte, F. J., u. H.-D. Henatsch: Zur Koppelung der intrafusalen und extrafusalen motorischen Innervation beim Frosch. Pflügers Arch. ges. Physiol. **266**, 292 (1958).

Smith, C. M., and K. R. Unna: Effects of acetylcholine and atropine on stretch receptors in frog muscle. Fed. Proc. **15**, 485 (1956).

Steinke, H. J., u. G. Vogel: Vergleichende Untersuchungen über den Angriffspunkt muskelerschlaffender Verbindungen. Pflügers Arch. ges. Physiol. **259**, 152 (1954).

Thesleff, St.: The mode of neuromuscular block caused by Acetylcholine, Nicotine, Decamethonium and Succinylcholine. Acta physiol. Scand. **34**, 218 (1955). — A further analysis of the neuromuscular block caused by Acetylcholine. Acta physiol. scand. **37**, 330 (1956).

Priv.-Doz. Dr. H.-D. Henatsch, Dr. med. F. J. Schulte, Physiologisches Institut, Göttingen, Kirchweg 7

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 264—274 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Karl-Marx Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. F. Hauschild)

Wirkungen von Atropinsulfat und Natriumdecylsulfonat auf isolierte Muskelpräparate

Von

V. Görisch

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Februar 1958)

Lüllmann, Förster u. Westermann beschrieben eine „paradoxe" Atropinwirkung, die sich am Rückenmuskel des Blutegels und am Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte als Verstärkung des Acetylcholineffektes äußerte. Die Autoren hielten es für wahrscheinlich, daß diese Erscheinungen auf die Hemmung der Cholinesterase durch Atropin zurückzuführen sind. Als jene Arbeit erschien, hatten zur Untersuchung einer anderen Frage angestellte Fermentversuche Ergebnisse geliefert, die dieser Deutung widersprachen. So ergab sich die Anregung zu weiteren Versuchen, über die hier berichtet werden soll.

1. Versuche am Blutegelrückenmuskel

Methode. Der Rückenmuskel des Blutegels wurde in der von Führer beschriebenen Weise präpariert. Besonders auf die sorgfältige Entfernung aller Ganglien ist geachtet worden. Als Badflüssigkeit diente eine gepufferte Salzlösung folgender Zusammensetzung:

Natriumchlorid	6,5 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Calciumchlorid (wasserfrei)	0,2 g
Primäres Natriumphosphat	1,44 g
n/10 Salzsäure	4 ml
Destilliertes Wasser auf	1000 ml

Die Wasserstoffionenkonzentration dieser Lösung wurde vor und nach ihrer Verwendung mit der Glaselektrode, später mit Lyphanpapier kontrolliert (p_H 7,2).

Die Versuche sind teils bei Zimmertemperatur (19 bis 22 °C), teils in der Kühlzelle bei + 12 °C durchgeführt worden. Die bei + 12 °C erhaltenen Kurven stiegen zwar langsamer an und waren im Durchschnitt kleiner, lieferten jedoch keine grundsätzlich anderen Ergebnisse.

So hergestellte und suspendierte Präparate zeigten keine Spontankontraktionen und stellten sich nach durchschnittlich einer Stunde auf ihren Ruhetonus ein. Dann wurden mit Acetylcholin submaximale Kontraktionen hervorgerufen, bis mindestens zwei aufeinander folgende Kurven die gleiche Höhe aufwiesen. Zwischen zwei

Testungen war jeweils eine Pause von 50 min eingeschaltet, während der zuerst 4 mal alle 5 min, danach alle 15 min Wechsel der Badflüssigkeit erfolgte. Nach Beendigung des eigentlichen Versuchs ist dann die gleiche Acetylcholindosis zur Kontrolle nochmals gegeben worden. Eine Auswertung der Ergebnisse wurde nur vorgenommen, wenn diese Kontraktion um weniger als 10% von der letzten Eichkurve zu Beginn des Versuchs abwich.

Ergebnisse. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluß Atropin auf die Acetylcholinkontraktion des Blutegelrückenmuskels hat. In Übereinstimmung mit LÜLLMANN u. Mitarb. ergab sich eine deutliche Verstärkung der Acetylcholineffekte am eserinisierten Präparat, wobei nur ein Anstieg um mehr als 10% gewertet wurde. Diese Zunahme trat auf, gleichgültig, ob das Atropin vor oder nach dem Acetylcholin gegeben worden war. Zusatz von Atropin auf der Höhe der Acetylcholinkontraktion führte zu einem weiteren, aufgepfropften Anstieg, der auch bei Eserinkonzentrationen beobachtet werden konnte, von denen man eine völlige Hemmung der Cholinesterase annehmen darf (1 : 250000, 1 : 100000, 1 : 25000). (Abb. 1.)

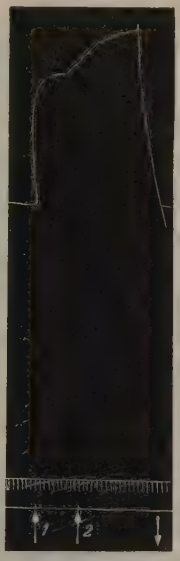


Abb. 1. Hirudo medicinalis, Rückenmuskel. Zeit: 1 min Physostigminsalicylat 10^{-5} (Endkonzentration). *1* Acetylcholinchlorid 10^{-10} (Endkonzentration). *2* Atropinsulfat $5 \cdot 10^{-5}$ (Endkonzentration)

Die gleichen Verstärkungseffekte mit Atropin ließen sich aber auch erzielen, wenn statt Acetylcholin zur Kontraktionsauslösung Cholin, Carbaminoylcholin (Doryl), Succinylbischolin (Succicuran) oder Dekamethonium (Dekacuran) gegeben wurden, wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen esteraseempfindlichen und den gegen dieses Ferment unempfindlichen Substanzen bestand.

Auch am nicht eserinisierten Präparat ergaben sich, wenn auch nicht mit gleicher Häufigkeit, die gleichen Effekte. In einigen Fällen gelang es sogar, allein durch Zugabe von Atropin zur Badflüssigkeit eine Kontraktion auszulösen. Wesentlich häufiger war dies an eserinisierten Präparaten zu beobachten. Die Zusammenstellung der Versuche findet sich in den Tab. 1 u. 2.

Auffällig war, daß in 8% aller Fälle nach höheren Atropinkonzentrationen Spontankontraktionen auftraten, die durch nachfolgende Gabe von Acetylcholin in der gleichen Dosierung, wie es zum Eintesten des Präparates benutzt worden war, in den meisten Fällen wieder zum Verschwinden gebracht werden konnten (Abb. 2 u. 3). Ein solches Auftreten von Spontankontraktionen am Rückenmuskel des Blutegels ist

Tabelle 1. *Kombinationseffekte mit Atropin*

Endkonzentration von	Physostigminsalicylat Endkonzentration	Atropinsulfat Endkonzentration	Zahl der Versuche	Verstärkung um mehr als 10%	ohne deutlichen Einfluß	Verminderung um mehr als 10%
Acetylcholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-6}$—10^{-7}	0	$5 \cdot 10^{-7}$	18	3	14	1
		$5 \cdot 10^{-6}$	18	10	8	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	18	6	11	1
		$5 \cdot 10^{-4}$	18	11	5	2
10^{-6}—10^{-8}	10^{-8}—10^{-6}	$5 \cdot 10^{-8}$	8	1	7	0
		$5 \cdot 10^{-7}$	8	4	3	1
		$5 \cdot 10^{-6}$	16	14	2	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	16	12	1	3
		$5 \cdot 10^{-4}$	16	10	5	1
$5 \cdot 10^{-8}$—10^{-10}	$4 \cdot 10^{-6}$— $4 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-7}$	18	5	13	0
		$5 \cdot 10^{-6}$	18	15	3	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	18	14	3	1
		$5 \cdot 10^{-4}$	20	16	4	0
Cholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-4}$—10^{-6}	0	$5 \cdot 10^{-6}$	12	4	7	1
		$5 \cdot 10^{-5}$	12	5	5	2
10^{-4}—$2 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	12	8	4	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	13	11	2	0
Carbaminoylcholinchlorid						
10^{-5}—$5 \cdot 10^{-8}$	0	$5 \cdot 10^{-6}$	12	8	3	1
		$5 \cdot 10^{-5}$	12	5	7	0
$5 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-8}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	12	5	7	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	14	6	6	2
Succinylcholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-5}$—10^{-5}	0	$5 \cdot 10^{-6}$	12	7	4	1
		$5 \cdot 10^{-5}$	12	5	5	2
$5 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	12	9	3	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	12	8	3	1
Dekamethoniumbromid						
$5 \cdot 10^{-6}$—10^{-7}	0	$5 \cdot 10^{-6}$	12	6	3	3
		$5 \cdot 10^{-5}$	12	6	5	1
$5 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-8}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	12	7	5	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	12	10	1	1

Tabelle 2. *Atropin allein*

Physostigminsalicylat Endkonzentration	Atropinsulfat Endkonzentration	Zahl der Versuche	Verstärkung um mehr als 10%	ohne deutlichen Einfluß	Verminderung um mehr als 10%
0	$5 \cdot 10^{-6}$	21	6	13	2
	$5 \cdot 10^{-5}$	20	7	10	3
10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	20	11	8	1
	$5 \cdot 10^{-5}$	20	14	5	1

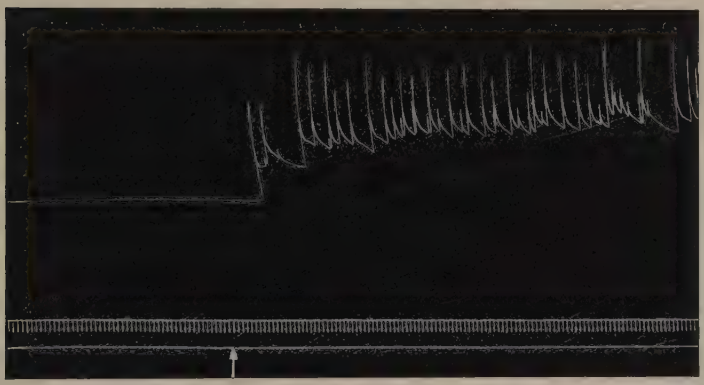


Abb. 2. Hirudo medicinalis, Rückenmuskel. Zeit: 1 min. ↑ Atropinsulfat $5 \cdot 10^{-5}$ (Endkonzentration)

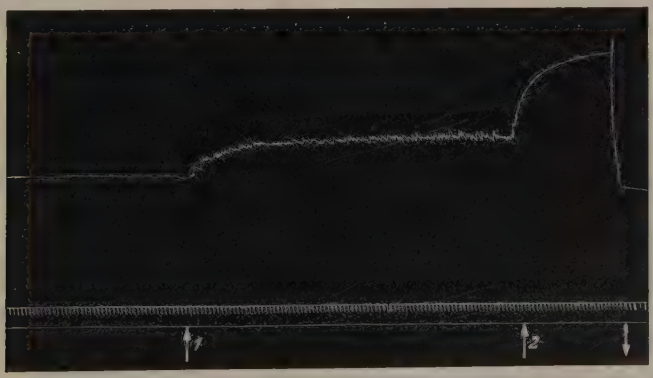


Abb. 3. Hirudo medicinalis, Rückenmuskel. Zeit: 1 min. Physostigminsalicylat 10^{-5} (Endkonzentration). *1* Atropinsulfat $5 \cdot 10^{-5}$ (Endkonzentration). *2* Acetylcholinchlorid $5 \cdot 10^{-8}$ (Endkonzentration)

von Asher bei der Untersuchung oberflächenaktiver Stoffe gesehen worden. Somit drängte sich die Frage auf, ob etwa die gleichen Verstärkungseffekte, die das Atropin bewirkte, auch durch Substanzen ausgelöst werden könnten, die als grenzflächenaktiv bekannt sind. Als

Tabelle 3. *Kombinationseffekte mit Decylsulfonat*

Endkonzentration von	Physostigminsalicylat Endkonzentration	Natrium-Decylsulfonat Endkonzentration	Zahl der Versuche	Verstärkung um mehr als 10%	ohne deutlichen Einfluß	Verminderung um mehr als 10%
Acetylcholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-6}$—10^{-7}	0	$5 \cdot 10^{-6}$	8	5	3	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	8	4	3	1
$5 \cdot 10^{-8}$—10^{-9}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	8	5	3	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	8	7	1	0
Cholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-4}$—10^{-6}	0	$5 \cdot 10^{-6}$	8	4	4	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	8	3	5	0
10^{-5}—10^{-6}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	8	5	3	0
		$5 \cdot 10^{-5}$	8	4	4	0
Carbaminoylcholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-6}$—10^{-8}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	9	6	3	0
Succinylcholinchlorid						
$5 \cdot 10^{-5}$ bis	0	$5 \cdot 10^{-6}$	5	4	1	0
$5 \cdot 10^{-6}$		$5 \cdot 10^{-5}$	5	3	2	0
$5 \cdot 10^{-5}$ bis	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	5	4	1	0
$5 \cdot 10^{-6}$		$5 \cdot 10^{-5}$	8	7	1	0
Dekamethoniumbromid						
$5 \cdot 10^{-6}$ bis	0	$5 \cdot 10^{-6}$	8	5	3	0
$5 \cdot 10^{-7}$		$5 \cdot 10^{-5}$	8	4	3	1
$5 \cdot 10^{-6}$ bis	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	8	8	0	0
$5 \cdot 10^{-7}$		$5 \cdot 10^{-5}$	8	5	3	0

Tabelle 4. *Decylsulfonat allein*

Physostigminsalicylat Endkonzentration	Natrium-Decylsulfonat Endkonzentration	Zahl der Versuche	Verstärkung um mehr als 10%	ohne deutlichen Einfluß	Verminderung um mehr als 10%
10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	9	8	1	0
	$5 \cdot 10^{-5}$	10	8	2	0

chemisch definierter Stoff dieser Gruppe wurde Natriumdecylsulfonat benutzt. Wie die Tab. 3 u. 4 zeigen, kann es diese Erscheinungen mit annähernd gleicher Häufigkeit wie Atropin hervorrufen.

Auch bei der Anwendung von Natriumdehydrocholat in Endkonzentrationen zwischen $5 \cdot 10^{-5}$ und $5 \cdot 10^{-6}$ konnten Kontraktions-

verstärkungen beobachtet werden, allerdings nicht so häufig wie bei Atropinsulfat und Natriumdecylsulfonat. Eine statistische Sicherung war in diesem Fall nicht möglich, weshalb auf die tabellarische Wiedergabe der Ergebnisse verzichtet werden soll.

Die oben angeführten Spontankontraktionen ließen den Verdacht aufkommen, in den betreffenden Präparaten hätten sich noch Ganglienzellen befunden. Carlström berichtete von solchen Zellen, die in der Muskelschicht liegen. Dennoch gehen die meisten Autoren von der Annahme aus, der Hautmuskelschlauch des Blutegels sei frei von Nervenzellen. Es wurden deshalb zwei Präparate, die besonders starke Spontankontraktionen zeigten, nach dem Versuch mit Formaldehydlösung fixiert, in Paraffin eingebettet und die daraus hergestellten Serienschnitte von etwa 5 μ Dicke mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Einige weitere Präparate kamen nicht als vollständige Serie, sondern nur in 20—40 Probeschnitten zur Untersuchung. Bei der mikroskopischen Durchmusterung der Objekte fanden sich mit dieser groben Methode keine Elemente, die als Ganglienzellen hätten angesprochen werden können. Die Beobachtungen von Heinrichs u. Rummel am Rattenuterus sprechen ebenfalls dafür, daß Atropin auch an ganglienfreien Muskelpräparaten Spontankontraktionen auszulösen vermag. Unter diesen Umständen könnten auch die älteren, von Le Heux am isolierten Darm erhaltenen Befunde in einem neuen Licht erscheinen, vor allem, wenn man berücksichtigt, daß die gegen Sauerstoffmangel besonders empfindlichen Ganglienzellen bei längerer Aufbewahrung in nichtdurchperlten Flüssigkeiten verhältnismäßig schnell zugrunde gehen.

2. Versuche am isolierten Darm

Isoliertes Jejunum von Ratten und Meerschweinchen wurde in der üblichen Weise suspendiert, nachdem es 24—36 Std im Kühlschrank bei + 6° C in nichtdurchperlter Ringer-Lösung aufbewahrt worden war. Atropinsulfat $3 \cdot 10^{-5}$—$3 \cdot 10^{-4}$ (46 Versuche) führte in 16 Fällen, Natriumdecylsulfonat in den gleichen Endkonzentrationen (47 Versuche) in 27 Fällen zur deutlichen Verstärkung der Acetylcholinkontraktion. Auch hier waren alle Effekte reversibel. Obwohl nur Präparate verwendet wurden, die zu Beginn des Versuches keine Spontankontraktionen zeigten, traten 7mal nach Zusatz von Atropin und 12mal nach Zusatz von Decylsulfonat Peristaltik bzw. Pendelbewegungen auf.

Diese beiden kleinen Serien reichen für eine strenge statistische Sicherung nicht aus, doch scheinen sie darauf hinzuweisen, daß auch am isolierten Warmblüterdarm der „paradoxe" Atropineffekt durch Decylsulfonat nachgeahmt werden kann.

3. Versuche am Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte

Methode. Das Präparat wurde mit geringen Abweichungen in der von Bülbring angegebenen Weise hergestellt und aufgehängt. Die mit Sauerstoff durchperlte Badflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung:

Natriumchlorid	8,0 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Calciumchlorid (wasserfrei)	0,2 g
Magnesiumchlorid	0,01 g
Natriumbikarbonat	1,0 g
Primäres Natriumphosphat	0,05 g
Dextrose	2,0 g
Destilliertes Wasser auf	1000,0 ml

Es erwies sich als günstig, den Thermostaten auf eine Temperatur von 33,5 $\pm$ 0,2° C einzustellen. Die indirekte Reizung erfolgte mittels Kippschwinger über Platinelektroden. In späteren Versuchen wurde abwechselnd direkt und indirekt gereizt. Dazu war am unteren Ende des zum Schreibhebel führenden Fadens ein Platinhäkchen befestigt, welches durch das über den Spiegel der Badflüssigkeit herausragende Sehnenende des Zwerchfells gespießt und durch einen spiralig aufgerollten, lackisolierten, feinen Draht mit dem einen Pol eines Rechteckströme liefernden starken Reizgenerators verbunden wurde. Den anderen Pol für die direkte Reizung bildete ein in die Badflüssigkeit eintauchendes 2 cm² großes Platinblech.

Ergebnisse. Die Verstärkung der sogenannten Wedensky-Hemmung durch Atropin ließ sich in 3 von 20 Versuchen reproduzieren. Als Nebenbefund fiel jedoch auf, daß bei einer größeren Zahl von Fällen die Effekte nach Atropinzusatz bei gleichbleibender elektrischer Reizung verstärkt wurden. Wie aus Tab. 5 zu ersehen ist, führt außer Atropin

Tabelle 5. *Wirkungen von Atropin und Decylsulfonat auf das Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte*

Endkonzentration von	Physostigminsalicylat Endkonzentration	Zahl der Versuche	Verstärkung um mehr als 10%	ohne deutlichen Einfluß	Verminderung um mehr als 10%
Atropinsulfat					
10^{-4}—$2 \cdot 10^{-6}$	0	24	7	14	3
10^{-4}—$2 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	20	14	6	0
Natriumdecylsulfonat					
$6 \cdot 10^{-5}$ bis $2 \cdot 10^{-6}$	0	24	12	10	2
$6 \cdot 10^{-5}$ bis $2 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	20	11	8	1

auch Decylsulfonat in geeigneter Dosierung am Rattenzwerchfell oftmals zu einer Verstärkung der Kontraktion bei gleichbleibender elektrischer Reizung. Diese fördernde Wirkung wurde zuerst bei indirekter Reizung gesehen, tritt aber auch manchmal bei direkter Reizung auf. Sie ist besonders deutlich an eserinisierten Präparaten (Abb. 4 u. 5).

Auffällig war, daß trotz der großen biologischen Verschiedenheit von Rattenzwerchfell, Warmblüterdarm und Blutegelrückenmuskel an diesen Präparaten Verstärkungseffekte durch Atropinsulfat und Natriumdecylsulfonat im gleichen Dosisbereich hervorgerufen wurden.

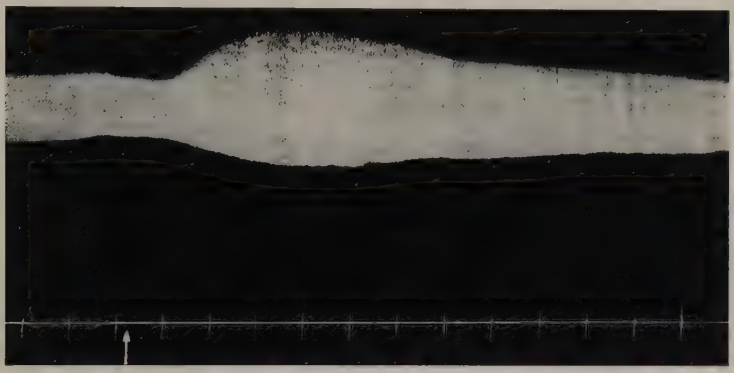
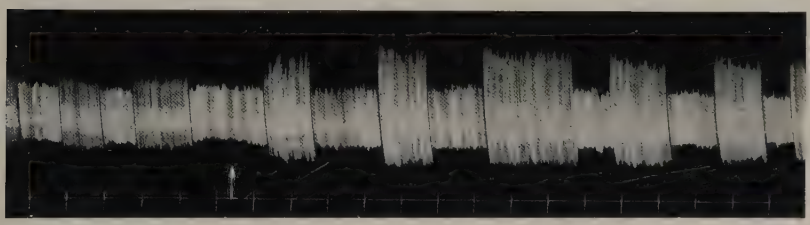


Abb. 4. Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte. Zeit: 1 min. Indirekte Reizung. Physostigminsalicylat 10^{-5} (Endkonzentration). ↑ Atropinsulfat 10^{-5} (Endkonzentration)



D J D J D J D J D J D J D J D J D J D

Abb. 5. Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte. Zeit: 1 min. *D* Direkte Reizung. *J* Indirekte Reizung. ↑ Atropinsulfat 10^{-5} (Endkonzentration)

Es lag deshalb nahe, als Ort dieser Wirkung die Muskelzelle, nicht aber nervale Elemente anzusehen, und nach einer Eigenschaft zu suchen, die beiden Substanzen, so verschieden sie in ihrem pharmakologischen Verhalten auch sonst sein mögen, in etwa gleichem Maße eigen ist.

4. Polarographie

Allgemein gilt heute die Hemmung des O_2-Maximums in polarographischen Kurven als Maß für die Grenzflächenaktivität zwischen flüssigen Phasen. Bestimmt wurde mit dem Heyrovský-Gerät, Typ 301, die 50%ige Dämpfung des O_2-Maximums einer luftgesättigten Kaliumchloridlösung durch Atropinsulfat und Natriumdecylsulfonat (Stackelberg). Im Elektrolysegefäß befanden sich 5 ml 0,001 n KCl-Lösung. Eine 50%ige Hemmung bewirkte Atropinsulfat in der Endkonzentration $0{,}4 \cdot 10^{-5}$, Natriumdecylsulfonat in der Endkonzentration 10^{-5}.

Dieses Ergebnis war zunächst erstaunlich, setzte doch das Fettalkoholsulfonat die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen Kaliumchloridlösung und Quecksilber weniger stark herab als das Atropinsalz, dessen Lösungen weit weniger schäumen.

5. Bestimmung der Oberflächenspannung gegen Luft mit der Ringabreißmethode

Bei der Bestimmung der Oberflächenspannung mit einem an einer Torsionswaage aufgehängten Platinring ergab sich dann auch ein völlig anderes Verhalten beider Substanzen an Grenzflächen ihrer Lösungen gegen Luft. Das Ergebnis der Versuche mit dem Ring ist als Kurve dargestellt, in der jeder Punkt zehn Messungen vertritt (Abb. 6).

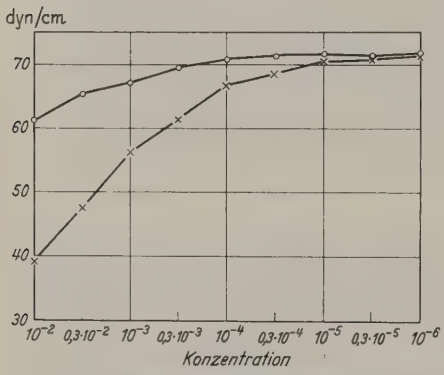


Abb. 6. Oberflächenspannung wäßriger Lösungen gegen wasserdampfgesättigte Luft bei 21° C.
×——× Natriumdecylsulfonat.
○——○ Atropinsulfat

Die Berechnung der Werte erfolgte nach den von einigen Druckfehlern befreiten Formeln im Perelman-Brodski.

Besprechung der Ergebnisse

Hardegg u. Mitarb. untersuchten eingehend die Wirkung von Atropin auf Cholinesterasen verschiedener Herkunft. Die in der vorliegenden Arbeit vorwiegend verwandten Atropinkonzentrationen bewirkten dabei keine Hemmung, sondern im Gegenteil oftmals eine Enthemmung der mit Prostigmin behandelten Fermente. Erst sehr viel höhere Atropindosen verminderten die Cholinesteraseaktivität in einem solchen Maß, daß dieser Mechanismus zur Erklärung der „paradoxen" Atropineffekte herangezogen werden könnte. Vielmehr deuten die hier dargestellten Befunde darauf hin, daß die bisher nur wenig beachtete Eigenschaft von Atropinlösungen, die Grenzflächen flüssiger Phasen zu beeinflussen, nicht nur für einige analytische Methoden bedeutungsvoll ist, sondern auch bei den sehr komplexen Wirkungen dieses Alkaloids auf das lebende Gewebe eine Rolle zu spielen vermag. In Anbetracht der immer zahlreicher werdenden Veröffentlichungen über „paradoxe" Wirkungen könnte diese Betrachtungsweise als Arbeitshypothese fruchtbar sein.

Allerdings sei betont, daß sich eine Beziehung zwischen pharmakologischer Wirkung und der an Grenzflächen gegen Luft gemessenen Oberflächenaktivität auch in unseren Versuchen nicht nachweisen ließ. Die stofflichen Eigenschaften, die für das Ausmaß der Dämpfung des

polarographisch bestimmten Sauerstoffmaximums durch die verschiedenen Substanzen verantwortlich sind, werden noch nicht völlig einheitlich angegeben, laufen aber nicht dem parallel, was landläufig als „Oberflächenaktivität" bezeichnet wird, wenn auch das gleiche Wort im polarographischen Schrifttum oft für jene stofflichen Eigenschaften steht (Literatur bei Heyrovský; Stackelberg; Březina u. Zuman). In diesen Monographien finden sich auch weitere Hinweise auf Beziehungen zwischen Wirkungen am biologischen Objekt und der Dämpfung von Maxima.

Untersuchungen in dieser Richtung scheinen um so aussichtsreicher, als Gale u. Scott berichteten, daß Decylsulfonat und einige Homologe die Spontanaktivität des Rattendarms steigern. Dagegen wirken sie am isolierten Schildkrötenherz negativ inotrop und chronotrop. Einen ähnlichen Effekt beschrieben Wedd u. Blair sowie Kisch auch vom Atropin.

Während Issekutz u. Mitarb. schon früher auf die Beziehungen zwischen Oberflächenaktivität und spasmolytischer Wirkung hinwiesen, haben neuerdings György u. Pórszász von „adrenolytischen" Effekten des Atropins berichtet, die unabhängig von der parasympathicolytischen und der spasmolytischen Komponente waren sowie an Nickhaut und Blutdruck der Katze nicht in annähernd vergleichbarer Stärke auftraten. Man könnte den Eindruck gewinnen, daß auch hier Beziehungen bestehen, zumindest was die inzwischen von Gaskell auch beim Menschen bestätigte Vasodilatation anbetrifft. Gefäßerweiternd wirken ebenfalls die Fettalkoholsulfonate, doch sind sie praktisch wegen ihrer hämolytischen Aktivität (Hutchinson u. Bean; Jung u. Mitarb.; Wiegershausen) nicht brauchbar. Ob allerdings bei ihnen tachyphylaktische Erscheinungen, wie sie von Scarinci sowie Gray u. Seevers für das Atropin beschrieben wurden, eine maßgebliche Rolle spielen, läßt sich nicht ohne weiteres sagen. Immerhin könnten weitere Untersuchungen in dieser Frage einige dem Kliniker häufig begegnende „paradoxe" Atropinwirkungen, z. B. auf Herz, Gefäßsystem, Pylorus und Cardia, erklären helfen.

Zusammenfassung

1. Am Rückenmuskel des Blutegels, am Warmblüterdarm und am Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte können Atropinsulfat und Natriumdecylsulfonat unter geeigneten Bedingungen kontraktionsverstärkend wirken.

2. Der mikroskopische Nachweis von Ganglienzellen im Blutegelrückenmuskel gelang nicht.

3. Atropin- und Decylsulfonatlösungen wurden auf ihre Hemmung des Sauerstoffmaximums bei polarographischen Bestimmungen untersucht.

4. Die Beziehungen zwischen einigen „paradoxen" Atropinwirkungen und der Grenzflächenaktivität werden kurz diskutiert.

Literatur

Asher, L.: Der Wirkungswandel neurovegetativer Arzneimittel. Bern 1941.

Březina, M., u. P. Zuman: Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie. Leipzig 1956.

Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946).

Carlström, B.: Scand. Arch. Physiol. **48**, 8 (1926).

Führer, H.: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 7, S. 463ff. (1923).

Gale, L. E., and P. M. Scott: J. Amer. pharm. Ass., sci. Ed. **42**, 283 (1953).

Gaskell, P.: J. Physiol. (Lond.) **131**, 639 (1956).

Gray, G. W., and M. H. Seevers: J. Pharmacol. exp. Ther. **113**, 319 (1955).

György, L., u. J. Pórszász: Acta physiol. Acad. Sci. hung. **5**, 181 (1954).

Hardegg, W., E. Rieken u. H. Schmalz: Pflügers Arch. ges. Physiol. **259**, 317 (1954).

Hardegg, W., R. Dohrmann u. D. Bechinger: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 55 (1955).

Heinrichs, D., u. W. Rummel: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **222**, 282 (1954).

Le Heux, J. W.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **179**, 177 (1920).

Heyrovský, J.: „Polarographie", Monographie in „Physikalische Methoden der analytischen Chemie". Herausgegeben von W. Böttger, 2. Teil, S. 120ff. Leipzig 1949.

Hutchinson, E., and K. E. Bean: Arch. Biochem. **58**, 81 (1955).

Issekutz, B. v., M. Leinzinger u. B. v. Issekutz jun.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **176**, 8 (1934).

Jung, F., J. Wendler u. B. Wiegershausen: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 281 (1956).

Kisch, B.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **116**, 227 (1926).

Lüllmann, H., W. Förster u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 8 (1952); **216**, 152 (1952).

Perelman, Ja. M., u. B. A. Brodski: Analyse fertiger Arzneimittelformen. 2. Ausgabe, S. 92ff. Berlin 1955.

Scarinci, V.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 775 (1955).

Stackelberg, M. v.: Polarographische Arbeitsmethoden. Berlin 1950.

Wedd, A. M., and Blair: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **60**, 64 (1945).

Wiegershausen, B.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 225 (1956).

Dr. V. Görisch, Pharmakol. Institut der Universität Leipzig, Härtelstr. 16—18

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 275—281 (1958)

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik (Ludolf Krehl-Klinik) Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes)

Hemmung der Dopadecarboxylase durch α-Methyldopa in vivo

Von
H. Dengler und G. Reichel

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. April 1958)

Ebenso wie für den *Abbau* der Phenylalkylamine Untersuchungen mit Aminoxydase-Inhibitoren wichtige Gesichtspunkte ergaben, könnte die Hemmung der enzymatischen Decarboxylierung des Dopa für das Studium der *Synthese* der Sympathicusstoffe Bedeutung erlangen. In vitro ist eine Hemmung der Dopadecarboxylase durch zahlreiche Stoffe möglich, die teils relativ unspezifisch, wie z. B. die Carbonylreagentien, teils mehr spezifisch wie bestimmte Derivate der Zimtsäure wirken. Die Wirksamkeit in vitro läßt keinen unmittelbaren Rückschluß auf eine solche auch in vivo zu, nicht nur deshalb, weil hier Toxicität und Eigenwirkung des Inhibitors eine entscheidende Rolle spielt. Selbst das im in vitro-Versuch nachgewiesene Fehlen einer Enzymaktivität in Organschnitten und Homogenaten von Tieren, die mit einem Ferment-Inhibitor vorbehandelt waren, ist kein Beweis für die Wirksamkeit desselben am intakten Tier, wie kürzlich am Beispiel der Iproniacid-Hemmung der Monoaminoxydase gezeigt wurde (Udenfriend, Weissbach u. Bogdanski). Da die aus Dopa und Dihydroxyphenylserin durch die Dopadecarboxylase entstehenden Amine Dopamin und Noradrenalin charakteristische Wirkungen am Blutdruck entfalten, schien uns die Untersuchung der Blutdruckwirkung der beiden Aminosäuren nach Verabreichung eines in vitro wirksamen Inhibitors der Dopadecarboxylase ein geeigneter Test zur Entscheidung der Frage zu sein, ob auch am intakten Tier eine Hemmung dieses Fermentes stattfindet. Über ähnliche Versuche mit nicht näher genannten Zimtsäurederivaten, die eine Hemmung von Dopa-Wirkungen möglich erscheinen ließen, berichteten Pogrund und Clark.

Methodik

Die Blutdruckversuche wurden an Katzen, Meerschweinchen und Ratten durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Blutdruckwirkungen einer Test-Dosis von Dopa und Dihydroxyphenylserin vor und nach Verabfolgung des Inhibitors miteinander verglichen. Als Inhibitor verwendeten wird das von Sourkes beschriebene, im folgenden kurz als α-Methyldopa bezeichnete DL-3,4-Dihydroxyphenyl-α-methylalanin (Merck Corporation, Rahway).

Die Versuche an *Katzen* wurden am Spinaltier gemacht. Zur Dekapitierung wurde das Rückenmark in Höhe des 2. Halswirbels unter Kontrolle des Auges durchtrennt. Blutdruckregistrierung mit einschenkeligem Hg-Manometer in der A. femoralis. Injektionen in die V. femoralis. Als Antikoagulans erhielten die Tiere 1 ml/kg Liquemin Roche i.v.

Meerschweinchen. Narkose mit 1,1 ml/100 g 25%iger Urethanlösung s.c. Blutdruckregistrierung mit einschenkeligem Hg-Manometer in der A. carotis. Sperrflüssigkeit: m/6 Natriumcitrat und 0,9%ige NaCl-Lösung zu gleichen Teilen. Injektionen in die V. jugularis. Antikoagulans 0,2 ml/100 g Liquemin Roche.

Ratten. Narkose mit 0,7 ml/100 g einer 25%igen Urethanlösung s.c. Blutdruckregistrierung in der A. carotis mit einschenkeligem Hg-Manometer. Injektionen in die V. femoralis. Antikoagulans 0,2 ml/100 g Liquemin Roche. Vor Beginn des eigentlichen Versuches erhielten die Tiere 0,1 mg/100 g Atropin. sulf. und 2—3 mg Hexamethoniumbromid (Gangliostat Pharmazell) i.v.

Substanzen[1]. L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Hoffmann-La Roche); threo-3,4-Dihydroxyphenylserin (Prof. Ehrhardt, Farbwerke Hoechst). Um injizierbare Volumina zu erhalten, mußten beide Substanzen durch vorsichtiges Erwärmen auf etwa 80°C in Lösung gebracht werden.

Hydroxytyramin-Hydrobromid (C. F. Boehringer); L-Noradrenalin-Bitartrat (Farbwerke Hoechst). Alle Dosisangaben beziehen sich auf die freie Base.

Pyridoxal-5-phosphat (Hoffmann-La Roche); Isopropylisonicotinsäurehydrazid-phosphat (Marsilid. Hoffmann-La Roche).

Ergebnisse

L-Dopa. Bei *Katzen* verursacht die i.v. Injektion von Dopa durch die intermediäre Entstehung des pressorisch wirksamen Dopamin langanhaltende Blutdrucksteigerungen. Zur Erzielung deutlicher Effekte (Druckanstieg 80—120 mm Hg) waren an der Spinalkatze 2,5 bis 4,0 mg/kg nötig. Methyldopa verhinderte in einer Dosis von 100 mg/kg i.m. oder i.v. den Blutdruckanstieg einer nachfolgenden Dopa-Injektion praktisch völlig (Abb. 1). Dabei war es gleichgültig, ob die Dosis auf einmal oder auf zwei bis drei Einzeldosen verteilt im Verlauf von etwa 1 Std gegeben wurde. In der genannten Dosierung hatte es keine sichere Eigenwirkung am Blutdruck. Die Aufhebung der Dopa-Wirkung tritt 10 bis 15 min nach Verabreichung des Inhibitors ein. Die pressorische Wirkung von Noradrenalin und Dopamin erfährt durch den Hemmstoff keine Veränderung; auch das Wirksamkeitsverhältnis der beiden Amine bleibt gleich. Auch an *Ratten* wirkt Dopa pressorisch; die verwendeten Dosen liegen — bei Vorbehandlung mit Atropin und Hexamethonium — bei 8 mg/kg. (Höhere Dosen würden ein zu großes Lösungsmittelvolumen verlangen.) Die Aufhebung der Dopa-Wirkung am Blutdruck gelingt hier bereits mit kleineren Mengen des Inhibitors. In allen Versuchen genügten 40 mg/kg (i.v. oder i.m.), wobei die volle Hemmwirkung nach 15—30 min eintrat. Bei kleineren Dosen war der durch Dopa verursachte Blutdruckanstieg nur abgeschwächt. Wegen der langen Wirkungsdauer des Inhibitors kann der Effekt einer nicht voll wirksamen Dosis durch erneute Gabe

[1] Den genannten Firmen danken wir für die Überlassung der Substanzen.

komplettiert werden, ohne daß eine wesentlich höhere Gesamtdosis erforderlich ist. Nach der Injektion von Methyldopa kam es meist zu einer mehrere Minuten anhaltenden Blutdrucksteigerung, die aber wohl kaum als Eigenwirkung der Substanz angesprochen werden kann, da sie nicht sicher von einem Volumeneffekt zu differenzieren war. Besonders deutlich ließ sich die vollständige Aufhebung der pressorischen Dopawirkung zeigen, wenn die Versuchstiere mit Iproniacid (50 mg/kg) vorbehandelt waren. Durch Hemmung der Aminoxydase tritt an der Ratte eine

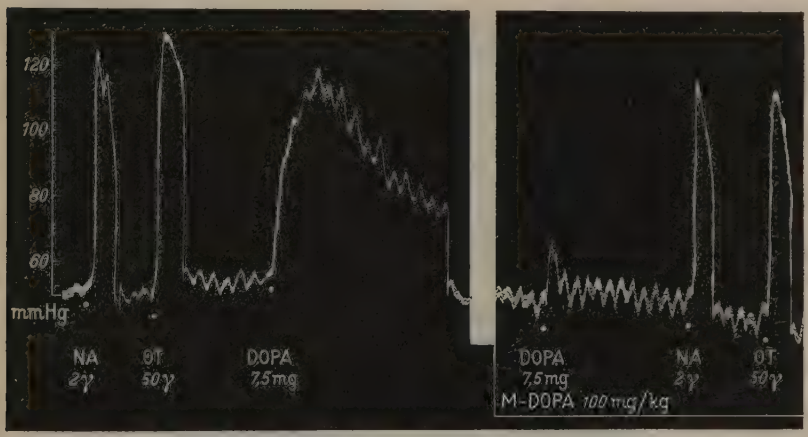


Abb. 1. Aufhebung der pressorischen Dopa-Wirkung an der Spinalkatze.
OT Oxytyramin; *NA* Noradrenalin

erhebliche Zunahme der pressorischen Wirkung des als Intermediärprodukt entstehenden Dopamin ein, ähnlich wie Balzer u. Holtz dies an der Katze gezeigt haben.

Daß die Verhinderung der blutdrucksteigernden Wirkung von Dopa durch Methyldopa nicht auf einem Antagonismus gegenüber pressorischen Wirkungen schlechthin beruht, sondern auf einer Hemmung der Dopadecarboxylase, zeigen Versuche am *Meerschweinchen*, bei denen das durch Decarboxylierung aus Dopa entstehende Dopamin nicht pressorisch, sondern depressorisch wirkt (Holtz u. Credner), wobei nach neueren Untersuchungen (Hornykiewicz) diese Wirkung dem Dopamin selbst und nicht dessen durch die Monoaminoxydase entstehenden Abbauprodukt Dihydroxyphenylacetaldehyd zukommt.

Der depressorische Effekt von 2—6 mg/kg Dopa ließ sich durch 50—80 mg/kg Methyldopa ebenfalls aufheben. Die Verhältnisse wurden aber am Meerschweinchen dadurch überlagert, daß Methyldopa selbst meist zu einer langanhaltenden Blutdrucksenkung von 10—35 mm Hg führte. Diese niedrige Ausgangslage des Blutdrucks ist für die Erzielung zusätzlicher depressorischer Effekte ungünstig. Wie Abb. 2 zeigt, ist eine

Dopa-Dosis, die anfangs weit wirksamer war als 6 γ Dopamin, nach der Injektion des Inhibitors jedoch völlig wirkungslos, während Dopamin den Blutdruck noch zu senken vermag.

Die Hemmung der Dopadecarboxylase durch Methyldopa hielt bei allen drei Tierarten stets bis zum Versuchsende (etwa 2 Std lang) an.

Dihydroxyphenylserin. Ähnlich wie Dopa durch intermediär entstehendes Dopamin könnte Dihydroxyphenylserin durch das aus ihm gebildete Noradrenalin eine protrahiert verlaufende Blutdrucksteigerung

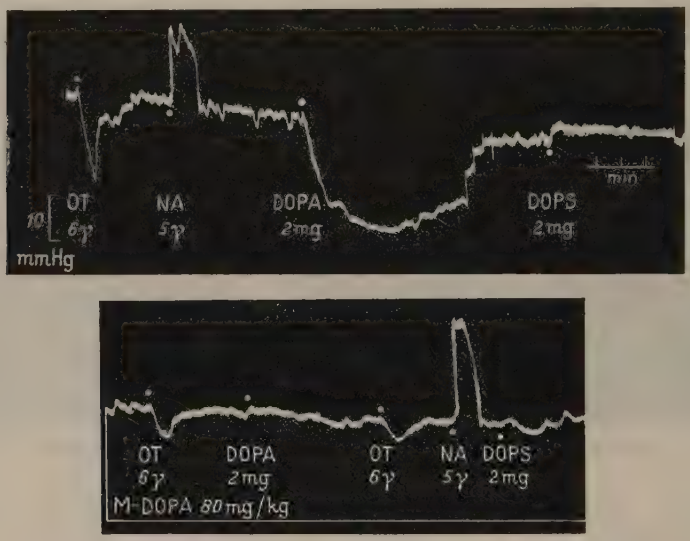


Abb. 2. Aufhebung der Dopa-Wirkung am Blutdruck des Meerschweinchens. *OT* Oxytyramin; *NA* Noradrenalin

hervorrufen. Wir vermochten jedoch nur bei mit Hexamethonium sensibilisierten *Ratten* mit hinreichender Sicherheit Effekte am Blutdruck zu erzielen, die man dieser Substanz bzw. ihren Metaboliten zuschreiben durfte. Die Blutdruckwirkung einer i.v. Injektion von 10 mg/kg Dihydroxyphenylserin besteht aus einem steilen initialen Druckanstieg und einer langanhaltenden Erhöhung des Blutdrucks (Abb. 3). Nach Injektion von 10—40 mg/kg Methyldopa, die zur vollständigen Aufhebung der Dopawirkung ausreichten, war der pressorische Effekt des Dihydroxyphenylserin jedoch nicht vollständig beseitigt.

Die Form der durch Dihydroxyphenylserin hervorgerufenen Blutdrucksteigerung ließ uns vermuten, daß der initiale Druckanstieg durch in dem Präparat enthaltenes Noradrenalin bedingt sein könnte, während die sich anschließende, länger dauernde Blutdrucksteigerung durch laufend aus der Decarboxylierung der Aminosäure anfallendes Noradrenalin unterhalten würde. So verhinderte denn auch Methyldopa in

Übereinstimmung mit dieser Vorstellung die sekundäre Blutdrucksteigerung völlig, während der initiale Druckanstieg unverändert bestehen blieb, ebenso wie die pressorische Wirkung einer Testdosis von Noradrenalin. Ließ man die verwendete Lösung von Dihydroxyphenylserin eine Noradrenalin retinierende Kationenaustauschersäule (Amberlite IRC 50) passieren, so verursachte diese am mit Methyldopa vorbehandelten Tier keinen primären Blutdruckanstieg mehr, sondern war vollständig wirkungslos. Die Anwesenheit von Noradrenalin in unseren Lösungen

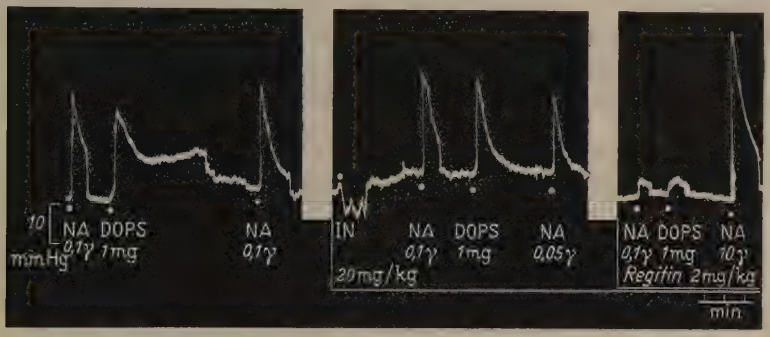


Abb. 3. Beeinflussung der Blutdruckwirkung von DOPS an der Ratte. *In* Methyldopa; *OT* Oxytyramin; *NA* Noradrenalin

wird auch dadurch wahrscheinlich, daß die nach Methyldopa restierende Drucksteigerung durch Regitin (2 mg/kg) im selben Maße abgeschwächt wurde, wie die einer vorher äquipressorischen Noradrenalindosis.

Bei diesen Versuchen ließ sich auch der Gehalt an Noradrenalin feststellen. Er betrug etwa 0,1‰ des Dihydroxyphenylserins. In guter Übereinstimmung damit standen die an der Spinalkatze ermittelten Werte. Hier bewirkte Dihydroxyphenylserin in Dosen von 5—7,5 mg/kg einphasige, in ihrer Form der äquipressorischer Noradrenalindosen ähnliche Blutdrucksteigerungen, eine protrahiert drucksteigernde Wirkung als Ausdruck der fermentativen Abspaltung von Noradrenalin fehlte. — Die Frage bleibt offen, ob für die Entstehung des Noradrenalins in den Lösungen die Erwärmung auf 80° C verantwortlich ist. Bekanntlich sind β-Hydroxycarbonsäuren relativ leicht zu decarboxylieren.

Besprechung der Ergebnisse

In Versuchen an Ratten, Meerschweinchen und Katzen ließ sich durch Vorbehandlung mit Methyldopa die Blutdruckwirkung von Dopa und Dihydroxyphenylserin (soweit diese nicht auf beigemengtem Noradrenalin beruhte) völlig aufheben. Da die Blutdruckwirkung der Amine — Dopamin bzw. Noradrenalin — selbst voll erhalten blieb, ist es wahrscheinlich, daß diese Wirkung des Methyldopa nicht auf einem unspezifischen Effekt beruht, sondern darauf, daß die Aktivität der vermutlich identischen Decarboxylasen so sehr gemindert wird, daß nicht mehr genügend Dopamin bzw. Noradrenalin pro Zeiteinheit gebildet werden, um

noch Blutdruckwirkungen hervorrufen zu können. Bei konstanter Dosis der beiden Aminosäuren ist für die Größe der Blutdruckwirkung einmal die vorwiegend in den großen parenchymatösen Organen lokalisierte Decarboxylaseaktivität, die die Menge des entstehenden Amins pro Zeiteinheit bestimmt, maßgebend, und zum anderen die Empfindlichkeit der Tierart gegen die gebildeten Pressorstoffe Dopamin und Noradrenalin. Diese beiden Faktoren sind von Bedeutung für die Dosis Methyldopa, die zur vollständigen Verhinderung der Blutdruckwirkung erforderlich ist. Hinzu kommt, daß wegen der verschiedenen Empfindlichkeit der Tierarten nicht mit gleichen Dopadosen pro Kilogramm Körpergewicht gearbeitet werden kann. In der nebenstehenden Tabelle haben wir unsere Versuchstierarten nach den einzelnen Kriterien gruppiert, wobei Empfindlichkeit

Tabelle

Empfindlichkeit gegen Dopamin	Dopa-Dosis	Dopadecarboxylase [1] Aktivität der Niere	Inhibitor-Dosis
M, K	R	M	K
—	—	R	M
R	M, K	K	R

gegen Dopamin, Höhe der verabreichten Dopadosis, Dopadecarboxylaseaktivität[1] und benötigte Inhibitordosis von oben nach unten jeweils abnehmen. Daraus ist gut zu verstehen, daß man beim Meerschweinchen (M) bei hoher Aktivität der Dopadecarboxylase und großer Empfindlichkeit gegen Dopamin selbst bei kleineren Dopadosen eine viel höhere Inhibitordosis benötigt als bei der sich gegensätzlich verhaltenden Ratte (R). Es bleibt jedoch unklar, warum man für die Katze (K), deren Enzymaktivität sehr viel geringer ist, gleichviel oder mehr Inhibitor benötigt als für das Meerschweinchen, es sei denn, man nimmt in vivo eine andere Verteilung der Enzymaktivitäten an.

Der Wirkungsmechanismus des Methyldopa wurde von Sourkes ausführlich untersucht. Die zunächst naheliegende Vermutung einer Reaktion desselben mit dem *Co-Ferment* hatte sich nicht bestätigt. Es wird vielmehr durch das Methyldopa am *Apoenzym* ein Haftpunkt der mannigfachen Substrate der Dopadecarboxylase, deren strukturelle Bedingungen heute relativ genau bekannt sind (siehe Sourkes; Schott u. Clark), besetzt, so daß das Dopa von seinem Platz am Ferment verdrängt wird. Die kinetische Analyse charakterisiert die Wirkung des Inhibitors als pseudo-irreversibel, was auf eine niedrige Enzym-Inhibitor-Dissoziations-Konstante schließen läßt. Diesem Wirkungsmechanismus würde entsprechen, daß es in unseren Tierversuchen auch nur in Einzelfällen möglich war, eine Reaktivierung der aufgehobenen Dopawirkung durch Pyridoxalphosphat zu erreichen.

[1] Versuche an der Warburg-Apparatur: Ansätze: 2,5 ml Nierenhomogenat 1 : 4 mit m/15-Phosphatpuffer p_H 6,8. Pyridoxalphosphat 100 γ, L-Dopa 10 μmol. N_2-Atmosphäre, Temperatur 37° C. Die nach 15 min entwickelte CO_2-Menge betrug im Durchschnitt: Meerschweinchen 8,6 μmol, Ratte 4,6 μmol, Katze 0,9 μmol.

Zusammenfassung

In Versuchen an Ratten, Meerschweinchen und Spinalkatzen wurde gezeigt, daß sich die durch Dopa und Dihydroxyphenylserin verursachten Blutdruckwirkungen durch Vorbehandlung der Tiere mit α-Methyldopa, einem Inhibitor der Dopadecarboxylase, aufheben lassen.

Literatur

Balzer, H., u. P. Holtz: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 547 (1956).

Holtz, P., u. K. Credner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **201**, 356 (1942).

Hornykiewicz, O.: Brit. J. Pharmacol. a. Chemoth. **13**, 91 (1958).

Pogrund, R. S., and W. G. Clark: XIX Intern. Physiological Congress, Abstracts Communications, Montreal, 682 (1953).

Schott, H. F., and W. G. Clark: J. Biol. Chem. **196**, 449 (1952).

Sourkes, T. L.: Arch. a. Biochem. a. Biophysics **51**, 444 (1954). — Rev. canad. Biol. **14**, 49 (1955).

Udenfriend, S., H. Weissbach and D. F. Bogdanski: J. Pharmacol. exp. Ther. **120**, 225 (1957).

Dr. H. Dengler und Dr. G. Reichel, Medizinische Univ.-Klinik, Heidelberg

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 282—290 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über den Hydroxytyramin- und Noradrenalingehalt der Lunge*

Von
H. J. Schümann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1958)

Da der Überträgerstoff sympathischer, „noradrenergischer" Nervenwirkungen aus *Hydroxytyramin* (Dopamin) gebildet wird, das seinerseits durch Decarboxylierung von *Dihydroxyphenylalanin* (Dopa) entsteht (Holtz, Heise, Lüdtke), ist verständlich, daß an den Stellen im Organismus, an denen *Noradrenalin* seine Funktion ausübt, auch *Dopamin* und *Dopadecarboxylase* vorkommen.

Postganglionäre sympathische Nerven (Milznerven) gehören zu den nervalen Strukturen mit höchster Dopadecarboxylaseaktivität (Holtz u. Westermann); in ihnen ließ sich auch Dopamin nachweisen, und zwar in fast ebenso großer Menge wie Noradrenalin (Schümann 1956). Während der eigentliche Wirkstoff der Nerven in granulären Elementen gespeichert wird, finden sich Dopamin und Dopadecarboxylase frei im Cytoplasma (Schümann 1958).

Biogene Amine kommen aber auch an solchen Stellen im Körper vor, mitunter sogar in relativ hoher Konzentration, an denen sie offensichtlich nicht gebildet, sondern nur gespeichert werden. Es sei auf den hohen Gehalt der Area postrema des Gehirns an *Serotonin* verwiesen, die das 5-Hydroxytryptophan decarboxylierende, serotonin-bildende Ferment nicht enthält (Gaddum u. Giarmann), ferner auf die Speicherung von Serotonin in den Thrombocyten, die es ebenfalls nicht bilden können, sowie auf den hohen *Histamin*gehalt der Lungen, die das Amin auch nur speichern, nicht jedoch durch Decarboxylierung von Histidin bilden, da sie keine Histidindecarboxylase besitzen.

Lungenextrakte sind, wie wir fanden, auch nicht in der Lage, Dopa zu Dopamin zu decarboxylieren. Wir haben untersucht, ob Dopamin, das in der an Dopadecarboxylase besonders reichen Leber und Niere (Holtz, Heise, Lüdtke; Holtz, Reinold, Credner) gebildet werden kann, vielleicht in der Lunge gespeichert wird. Die Lunge als Organ interessierte uns auch deshalb, weil bei elektrischer Stimulierung des sympathischen Grenzstranges das besonders stark bronchodilatatorisch wirkende

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Isopropylnoradrenalin im Lungenvenenblut von Katzen auftreten soll (M. Lockett). — Während unserer Untersuchungen erschien eine Mitteilung von v. Euler u. Lishajko, daß Rinderlunge neben Noradrenalin ungefähr 1 μg Hydroxytyramin pro Gramm Frischgewebe enthalte.

Methodik

1. Extraktherstellung. Frisches Lungengewebe (100—300 g) verschiedener Tierarten wurde homogenisiert und mit dem dreifachen Volumen salzsauren Alkohols (4 ml konz. HCl auf 1000 ml 96% Äthyl-Alkohol) $^1/_2$ Std lang im Eisschrank extrahiert. Der beim Abnutschen erhaltene Rückstand wurde nochmals mit den $1^1/_2$fachen Volumen HCl-Alkohol extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum bei 40—50° C bis fast zur Trockne gebracht, der Rückstand in 60 ml n-Butanol (gesättigt mit n/10 HCl) aufgenommen und das Filtrat dreimal mit je 20 ml n/200 HCl im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die saure wäßrige Lösung wurde nach Vertreiben der Butanol-Reste im Vakuum mit 3 ml 10%igem Aluminiumsulfat pro 100 g Gewebe versetzt, mit n/2 NaOH auf p_H 7,6 gebracht. Der ausflockende Niederschlag von Aluminiumhydroxyd, der die Brenzkatechinamine adsorbiert hält, wurde abzentrifugiert und mit einigen Millilitern n-H_2SO_4 gelöst; die schwefelsaure Lösung wurde mit 0,5 n NaOH auf p_H 3,5 gebracht und das ausfallende Aluminiumhydroxyd abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem fünffachen Volumen Äthanol-Aceton (1 : 1) versetzt. Nach 12stündigem Stehen bei 4° C wird abfiltriert, das Filtrat zur Trockne gebracht und in wenigen Millilitern Aqua dest. aufgenommen. In einem aliquoten Teil wurde der Brenzkatechinamingehalt *colorimetrisch* nach der Methode von v. Euler u. Hamberg und *fluorimetrisch* nach v. Euler u. Floding bei p_H 6,0 bestimmt. Der Rest wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und in soviel 85% HCl-Alkohol aufgenommen, daß 30 μg Noradrenalinäquivalente (colorimetrisch bestimmt) in 0,15 ml enthalten waren.

2. Papierchromatographie. (Schl. & Sch.-Papier 2043b.) *Ascendierend* in 85% Phenol + 15% n/10 HCl (M. Vogt); *descendierend* in n-Butanol/n/1 HCl (Hamberg u. v. Euler 1950). 24° C; CO_2-Atmosphäre. Laufzeit 20—70 Std. Entfernung des Phenols durch mehrmaliges Waschen der Chromatogramme mit Benzol. Anfärbung mit Kaliumferricyanid-Phosphatpuffer (James) bzw. zusätzlich mit $FeCl_3$ (0,5% in 6,5% Phosphorsäure): Berlinerblaureaktion nach Goldenberg. — *Elution.* Die für die Elution vorgesehenen Papierstreifen wurden mit der Schere möglichst klein zerschnitten und mit 10—15 ml n/100 HCl dreimal extrahiert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und in einem kleinen Volumen Aqua dest. aufgenommen. Durch das Chromatographie- und Elutionsverfahren traten je nach der aufgetragenen Aminmenge Verluste von 30—40% ein.

3. Die Testung am Blutdruck (A. carotis) erfolgte an Ratten und Meerschweinchen in Urethannarkose (1,75 g/kg s.c.). Die Tiere erhielten vor Versuchsbeginn 20 mg/kg Vetren (PROMONTA) und 1 mg/kg Atropin sulf., die Ratten zusätzlich noch 10 mg/kg Hexamethonium i.v.

Ergebnisse

1. Schafslunge. *a) Papierchromatographischer Nachweis von Hydroxytyramin.* Das in der Abb. 1 dargestellte Chromatogramm wurde nach Auftragen von 0,075 ml Extrakt (= 15 μg Noradrenalinäquivalente, colorimetrisch bestimmt) unter Verwendung von Phenol-HCl als Lösungsmittel gewonnen. Die Entwicklung mit Kaliumferricyanid und

$FeCl_3$ (Berlinerblaureaktion) ergibt einen intensiv gefärbten Fleck, der in Höhe des dem Hydroxytyramin des Testchromatogramms entsprechenden R_f-wertes liegt. Chromatographiert man in Butanol-HCl anstatt in Phenol-HCl (Abb. 2), so ist die Wanderungsgeschwindigkeit des Hydroxytyramins größer als diejenige des Adrenalins (siehe Testchromatogramm in Abb. 2). Auch jetzt zeigt sich, daß das im Lungenextrakt vorhandene Brenzkatechinamin seinem R_f-Wert nach mit dem Hydroxytyramin (H) des Textchromatogramms übereinstimmt. Außer Hydroxytyramin ließ sich kein anderes Amin nachweisen.

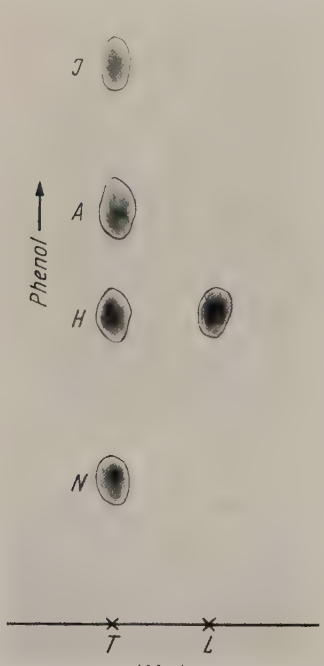


Abb. 1

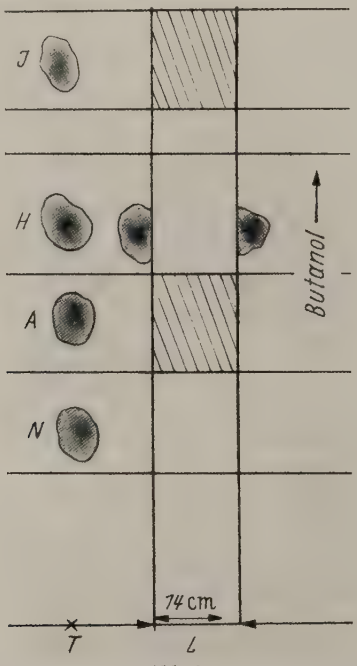


Abb. 2

Abb. 1. *Papierchromatographischer Nachweis von Hydroxytyramin in Schafslunge.* *L* 0,075 ml eines Extraktes aus Schafslunge (colorimetrisch 15 μg Noradrenalinäquivalente). — *T* Testchromatogramm: je 15 μg Noradrenalin (*N*), Hydroxytyramin (*H*), Adrenalin (*A*), Isopropylnoradrenalin (*J*). — Ascendierend in Phenol-HCl. 36 Std. Berlinerblaureaktion nach Goldenberg

Abb. 2. *Papierchromatogramm eines Extraktes aus Schafslunge.* *L* Chromatogramm des Lungenextraktes (500 μg Hydroxytyraminäquivalente). — *T* Testchromatogramm: je 15 μg Noradrenalin (*N*), Hydroxytyramin (*H*), Adrenalin (*A*), Isopropylnoradrenalin (*J*). — Descendierend Butanol-HCl. Laufzeit 70 Std. — Der teilweise schraffierte Vertikalstreifen von 14 cm Breite wurde in Horizontalstreifen zerlegt. Die dem R_f-Wert des Adrenalins, Noradrenalins Hydroxytyramins und Isopropylnoradrenalins entsprechenden Streifen wurden eluiert und am Ratten- bzw. Meerschweinchenblutdruck auf ihren Katecholamingehalt untersucht (siehe Abb. 4)

b) Colorimetrische und fluorimetrische Bestimmung von Hydroxytyramin. Hydroxytyramin verhält sich bei der *colorimetrischen* Bestimmung (Oxydation mit Jod bei p_H 6,0) ähnlich wie Noradrenalin, indem es im Spectralphotometer bei gleichen Ablesebedingungen (529 mμ) 85%

der Extinktion einer Noradrenalinstandardlösung ergibt (Dengler, Schümann 1958); bei der *fluorimetrischen* Bestimmung (ebenfalls bei p_H 6,0) reagiert es 200 mal schwächer als Noradrenalin. Colorimetrisch ist deshalb eine quantitative Bestimmung des Hydroxytyramins im Extrakt möglich; fluorimetrisch müßten kleine etwa vorhandene Beimengungen von Noradrenalin und Adrenalin sich erfassen lassen.

Tabelle 1. *Hydroxytyramin- und Noradrenalingehalt der Lunge auf Grund colorimetrischer und fluorimetrischer Bestimmungen* (siehe Methodik und Text)

Vers. Nr.	Tierart	Hydroxytyramin µg/g colorim.	Noradrenalin µg/g fluorim.	Noradrenalin %
1	Schaf	47,3	0,1	0,21
2	Schaf	10,2	0,06	0,59
3	Schaf	20,7	—	—
4	Schaf	18,5	0,1	0,54
Mittel		24,2	0,09	0,45
5	Rind	1,0	0,011	1,1
6	Rind	0,8	0,018	2,2
7	Rind	1,4	—	—
8	Rind	1,4	0,013	0,9
Mittel		1,1	0,014	1,4
9	Hund	0,4	0,028	6,5
10	Hund	0,2	0,01	4,8

Die Ergebnisse der colorimetrischen Bestimmung von Extrakten aus 4 Schafslungen sind in der Tab. 1 dargestellt. Die Werte schwanken zwischen 10,2 und 47,3 µg Hydroxytyramin pro 1 g Frischgewebe. Im Mittel der 4 Versuche beträgt der Hydroxytyramingehalt 24,2 µg/g.

3 Extrakte wurden auch fluorimetrisch bestimmt. Da die Extrakte, wie die folgenden Versuche zeigen werden, kein *Adrenalin* enthalten, geben die fluorimetrisch ermittelten Werte annähernd den Noradrenalingehalt an. Er betrug durchschnittlich 0,21 µg/g. Um jedoch den wahren Noradrenalingehalt zu ermitteln, muß noch die dem im Extrakt vorhandenen Hydroxytyramin zukommende Fluorescenz in Abzug gebracht werden ($^1/_{200}$ des colorimetrisch ermittelten Hydroxytyraminwertes). Alle in der Tab. 1 angegebenen Noradrenalinwerte sind entsprechend korrigiert. Der durchschnittliche Noradrenalingehalt betrug nach der Korrektur nur 0,09 µg/g = 0,45 % der Katecholamingesamtgehaltes.

c) Biologischer Nachweis von Hydroxytyramin. Hydroxytyramin wirkt an der Ratte blutdruck*steigernd*; am Kaninchen und Meerschweinchen blutdruck*senkend* (Holtz u. Credner 1942). Ein Extrakt aus

Schafslunge (siehe Methodik unter 1) wurde das eine Mal 200fach mit Aqua dest. verdünnt und am *Ratten*blutdruck, das andere Mal 20fach verdünnt und am *Meerschweinchen*blutdruck gegen Hydroxytyramin ausgetestet (Abb. 3). Die blutdrucksteigernde bzw. -senkende Wirkung von 0,2 ml Extrakt stimmt mit derjenigen von 3 bzw. 30 µg Hydroxytyramin überein.

d) Versuche zum Nachweis von Adrenalin, Isopropylnoradrenalin und Noradrenalin. Um auch kleine Mengen von Noradrenalin, Adrenalin und Isopropylnoradrenalin chromatographisch nachweisen zu können, wurden Extraktmengen mit einem Gehalt von 500—1000 µg Hydroxytyraminäquivalenten chromatographiert.

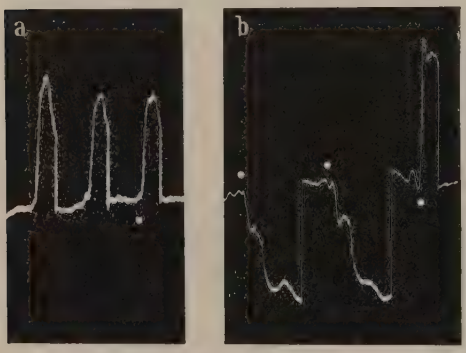


Abb. 3. *Austestung eines Extraktes aus Schafslunge am Blutdruck.* a Rattenblutdruck; b Meerschweinchenblutdruck. *N* Noradrenalin. *H* Hydroxytyramin; *E* Lungenextrakt (siehe Text)

In dem Versuchsbeispiel der Abb. 2 waren 500 µg Hydroxytyraminäquivalente eines Lungenextraktes (L) in 16 cm Breite und als Test (T) je 15 µg Noradrenalin, Adrenalin, Hydroxytyramin und Isopropylnoradrenalin zur Chromatographie aufgetragen. Nach 70 Std Laufzeit in Butanol-HCl wurde ein 14 cm breiter Vertikalstreifen aus der Mitte des Extraktchromatogramms so herausgeschnitten, daß je 1 cm an den Seiten zurückblieb. Das Testchromatogramm und die Reste des Extraktchromatogramms wurden mit Kaliumferricyanid besprüht. Nur in der Höhe des dem Hydroxytyramin entsprechenden R_f-Wertes entstanden gefärbte Flecken.

Darauf wurden die in der Abb. 2 teilweise schraffiert gezeichneten, 14 cm breiten Flächen den R_f-Werten der verschiedenen Amine entsprechend in waagerechte Streifen unterteilt und mit n/100 HCl eluiert. Die Eluate wurden colorimetrisch, fluorimetrisch und am Blutdruck untersucht. Indem Eluat aus dem „Adrenalinstreifen" des Papierchromatogramms ließ sich weder am Rattenblutdruck noch fluorimetrisch Adrenalin nachweisen, die Eluate des Noradrenalin- bzw. Hydroxytyraminstreifens verhielten sich colorimetrisch und fluorimetrisch sowie im biologischen Test (Ratten- bzw. Meerschweinchenblutdruck) wie die reinen Amine. Das Eluat des „Isopropylnoradrenalinstreifens" wirkte an der Ratte nicht

blutdrucksenkend wie Isopropylnoradrenalin, sondern blutdruck*steigernd* (Abb. 4). 0,002 µg Isopropylnoradrenalin hätten schon deutlich depressorisch gewirkt (siehe Abb. 4). Die das Isopropylderivat vortäuschende blutdruck*steigernde* Substanz könnte der Äthyläther des Noradrenalins — 2 Äthoxy-2- (3,4-dioxyphenyl-äthylamin) — sein; denn dieser verhält sich papierchromatographisch (R_f-Wert) bei der Entwicklung mit Butanol-HCl ähnlich wie Isopropylnoradrenalin und wirkt an der Ratte blutdrucksteigernd. Er kann bei der Extraktion von Noradrenalin aus Gewebe mit HCl-Äthanol und anschließendem Einengen der Extrakte im Vakuum bei 40—50% entstehen (Serlin u. Goldenberg; Dengler). Für unsere Versuche haben wir durch 1stündiges Erhitzen (70° C) der salzsauren alkoholischen Noradrenalinlösung (5 ml konz. HCl + 1000 ml Äthanol 96%) den Noradrenalinäthyläther dargestellt und durch Chromatographie in Butanol-HCl von Noradrenalinresten abgetrennt.

Abb. 4. *Untersuchung des Eluats aus dem „Isopropylnoradrenalinstreifen" des Chromatogramms aus Abb. 2 am Rattenblutdruck.* *N* Noradrenalin; *J* Isopropylnoradrenalin; *E* Eluat (siehe Text)

2. Rinderlunge und Hundelunge. Wie die Schafslunge, so enthält auch die Rinderlunge überwiegend *Hydroxytyramin*, daneben kleine Mengen Noradrenalin. *Adrenalin* und *Isopropylnoradrenalin* ließen sich auch mit papierchromatographischer Methodik nicht nachweisen. Colorimetrische und fluorimetrische Bestimmungen ergeben in Übereinstimmung mit v. Euler u. Lishajko im Mittel von 4 Versuchen 1,1 µg/g Hydroxytyramin und 0,014 µg/g Noradrenalin (Tab. 1, Vers. Nr. 5—8), d. h. nur 1,4% der Gesamtkatechole sind Noradrenalin. Der Hydroxytyramingehalt der Rinderlunge ist demnach bei ungefähr gleicher prozentualer Beteiligung von Noradrenalin fast 20 mal geringer als derjenige der Schafslunge. Noch niedriger ist der Hydroxytyramingehalt der Hundelunge. Er betrug in 2 Versuchen 0,2 bzw. 0,4 µg/g. Der Noradrenalinanteil machte 4,8—6,5% aus (Tab. 1, Vers. Nr. 9 u. 10).

Diskussion

Der Nachweis von Hydroxytyramin in Milznerven und Milz, das hier bis zu 50% der Gesamtbrenzkatechinamine ausmacht, hatte schon in früheren Arbeiten (Schümann 1956; 1958) die Frage aufwerfen lassen, ob dem Amin die Rolle der biochemischen Vorstufe des Noradrenalins oder auch die des selbständigen Wirk- und Überträgerstoffes zukomme. Die Frage stellt sich erneut in dieser Arbeit, in der nachgewiesen wird,

daß Hydroxytyramin praktisch das einzige Brenzkatechinamin der Lunge ist. Denn die kleinen in Lungenextrakten nachweisbaren Noradrenalinmengen dürften aus den mitextrahierten Lungengefäßen stammen.

1. Von einem spezifischen Wirkstoff der Lunge könnte man vielleicht erwarten, daß er besonders stark ausgeprägte bronchodilatatorische Wirkung besitzt. In Versuchen an Katzen und Meerschweinchen haben wir den durch i.v. Injektion von Histamin und Serotonin ausgelösten Bronchospasmus (Registrierung nach der Methode von Konzett u. Rössler) durch gleichzeitige Injektion von Brenzkatechinaminen (Adrenalin, Noradrenalin und Hydroxytyramin) abzuschwächen versucht. Hydroxytyramin war wirkungslos, selbst wenn es in 100fach höherer Dosierung (50—200 μg/kg) als einer broncholytisch wirksamen Adrenalindosis entsprach, injiziert wurde.

2. Auch bei Zusatz von Pyridoxal-5-phosphat, dem Coferment der Aminosäurendecarboxylasen, läßt sich in manometrischen Versuchen (Warburg-Apparatur) mit Lungenextrakten keine Dopadecarboxylase nachweisen. Das Hydroxytyramin der Lunge wird demnach nicht in diesem Organ gebildet, sondern nur gespeichert. Ebenso unwahrscheinlich wie eine — etwa broncholytische — Wirkstoffunktion ist deshalb vielleicht die Funktion der Muttersubstanz für eine Noradrenalinsynthese in der Lunge.

3. Am wahrscheinlichsten dürfte sein, daß das Hydroxytyramin der Lunge aus der in der Leber erfolgenden Decarboxylierung von Dopa stammt, indem es in der Lunge abgefangen und gespeichert wird. Der bei den untersuchten Tierarten so verschieden hohe Gehalt des Lungen-

Tabelle 2. *Dopadecarboxylaseaktivität von Schafs- und Rinderleber*
Warburg-Apparatur. Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2
N_2-Atmosphäre. 37° C
Versuchsansätze. 2,0 ml Leberhomogenat 1 : 3 in m/15 Phosphatpuffer p_H 6,8 + 0,4 ml Dopa (2 mg) + 0,2 ml Aqua dest. bzw. 0,2 ml (50 μg) Pyridoxal-5-phosphat (Py)

Vers. Nr.	$mm^3/CO_2/30$ min			
	Schaf		Rind	
	—	+ Py	—	+ Py
1	34	92	8	71
2	32	89	10	73
3	28	75	2	116

gewebes an Hydroxytyramin — Schafslunge enthält 20mal mehr als Rinderlunge und 40—80mal mehr als Hundelunge — könnte dann seine Ursache in einer verschieden starken Hydroxytyraminbildung bzw. einer verschieden hohen Dopadecarboxylaseaktivität der Leber haben. Die in der Tab. 2 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß die Ferment-

aktivität der Schafsleber tatsächlich höher ist als die der Rinderleber. Erst nach Zugabe von Coferment (Pyridoxal-5-phosphat) vermag auch die Rinderleber zugesetztes Dopa in nahezu gleichem Ausmaß zu decarboxylieren wie Schafsleber.

4. Möglicherweise kann das in der Lunge gespeicherte Hydroxytyramin unter bestimmten Bedingungen dem Herzen für die Synthese von Noradrenalin und Adrenalin zur Verfügung gestellt werden.

Summary

1. Dopamine represents more than 90% of the catechol amines found in lung tissue. This has been demonstrated by paperchromatography, colorimetric, fluorimetric and biological methods. The mean dopamine content of lungs is: sheep 24 μg/g, ox 1,1 μg/g and dog 0,3 μg/g. Apart from dopamine sheep lungs contained about 0,45%, ox lungs 1,4% and dog lungs 4,8—6,5% of noradrenaline.

2. No adrenaline or isopropyl-noradrenaline could be detected.

3. Manometric experiments showed that dihydroxyphenylalanine (dopa) will not be decarboxylated by extracts of lung tissue although the coenzyme pyridoxal-5-phosphate had been added. Therefore the dopamine of the lung can not be formed by this tissue itself.

4. Without addition of pyridoxal-5-phosphate the decarboxylation of dopa by ox liver was week compared with the activity of sheep liver. This agrees with the different dopamine content of ox and sheep lung respectively and *suggests* that dopamine is formed in the liver, secreted into the blood, and taken up by the lungs.

Fräulein Christiane Bischof und Frau Frauke Kosciessa danke ich für ihre Mitarbeit.

Literatur

Dengler, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 373 (1957).

Euler, U. S. v., and U. Hamberg: Acta physiol. scand. **19**, 74 (1949).

Euler, U. S. v., and J. Floding: Acta physiol. scand. **33**, Suppl. **118**, 45 (1955).

Euler, U. S. v., and J. Lishajko: Acta physiol. pharmacol. neerl. **6**, 295 (1957).

Gaddum, J. H., and N. J. Giarman: Brit. J. Pharmacol. **11**, 88 (1956).

Goldenberg, M., M. Faber, E. J. Alston and E. C. Chargaff: Science **1949**, 534.

Hamberg, U., and U. S. v. Euler: Acta chem. scand. **4**, 1185 (1950).

Holtz, P., R. Heise u. K. Lüdtke: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **191**, 87 (1938).

Holtz, P., A. Reinhold u. K. Credner: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **261**, 278 (1939).

Holtz, P., u. K. Credner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **200**, 356 (1942).
Holtz, P., u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 538 (1956).
James, W. O.: Nature (Lond.) **1948**, 851.
Konzett, H., u. R. Rössler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **195**, 71 (1940).
Lockett, M. F.: Brit. J. Pharmacol. **12**, 86 (1957).
Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 566 (1956).
Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 17 (1958).
Serlin, J., and M. Goldenberg: Biochemic. J. **54**, 483 (1953).
Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 325 (1952).

Professor Dr. H. J. Schümann,
Pharmakologisches Institut der Univ. Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 14

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 291—302 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. W. Neumann)

Über das thrombinähnlich wirkende Prinzip von Jararacagift

Von
Ernst Habermann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Mai 1958)

Von den in großer Zahl bekannten gerinnungsfördernden Wirkungen von Schlangengiften (Übersicht bei Deutsch) konnte bisher noch keine einer einheitlichen, definierten Giftkomponente zugeschrieben werden. Mehrere Autoren trennten ein „Koagulin" von toxischeren Faktoren, Holtz u. Raudonat auch ein thrombinähnlich wirkendes Prinzip von einem prothrombinaktivierenden, aber bisher wurden die erhaltenen Präparate nie gleichzeitig nach pharmakologischen, biochemischen und physikochemischen Kriterien näher charakterisiert. Bei Untersuchungen über das thrombinähnlich wirkende Prinzip aus dem Gift der südamerikanischen Bothrops jararaca sahen wir unsere Aufgabe darin, den Wirkstoff möglichst weit anzureichern und dabei gleichzeitig den Verbleib der verschiedenen anderen Giftqualitäten zu verfolgen, um auf eine Verknüpfung der thrombinähnlichen mit anderen Wirkungen des Giftes prüfen zu können[1].

Einzelheiten zur Methodik

a) Pharmakologische Verfahren. *Thrombinähnliche Wirkung.* Das zu testende Material wird in 0,1% Serumalbuminlösung mit 0,85% Kochsalz gelöst, davon 0,1 ml mit 0,1 ml Veronalnatrium—Salzsäure-Puffer (p_H 6,8) versetzt, einige Minuten auf 37° C erwärmt, dann 0,1 ml einer 0,5%igen Fibrinogenlösung mit 0,85% Kochsalz zugesetzt; mittels einer Platinöse, die genau alle 5 sec aus der Mischung gehoben wird, bestimmt man die Zeit bis zum Erscheinen des ersten bleibenden Fibrinfadens.

Prothrombinaktivierung. Siehe Tab. 4.

Bestimmung der *Blutungszeit* an der weißen Maus: Das Tier wird in einem der Körperform angepaßten Metallbehälter fixiert, eine Schwanzvene mit einer Rasierklinge quer angeschnitten, der Schwanz in 25 ml 0,85% Kochsalzlösung von

[1] *Anmerkung bei der Korrektur.* Kürzlich konnten Henriques u. Mitarb. [Biochem. J. **68**, 597 (1958)] mit chemischen und enzymchemischen Verfahren eine Differenzierung von Casein- und Benzoylargininamidspaltung durch Jararacagift und eine Konzentrierung der letzteren erzielen. Ob Amidase und thrombinähnliche Wirkung miteinander verknüpft sind, müßte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zimmertemperatur (20—21° C) getaucht und die Zeit vom Erscheinen des ersten Blutstropfens bis zum (deutlich erkennbaren) Abreißen des Blutfadens gestoppt.

Bestimmung der *Gerinnungszeit* an der weißen Maus: Das Schwanzende wird mit scharfer Schere gekappt; einige Blutstropfen werden auf einem Uhrglas aufgefangen. Unmittelbar über der Wasserfläche eines auf 37° C eingestellten Thermostaten wird mittels Platinöse die Koagulationszeit bestimmt.

Lokalisierung des Gerinnungsdefekts bei giftbehandelten Mäusen und Kaninchen. Mäuseblut wurde nach Dekapitation in einem festes Natriumcitrat (etwa 2 mg/0,5 ml) enthaltenden Glasschälchen aufgefangen. Kaninchenblut wurde durch Punktion der Ohrvene mittels einer 0,1 ml 7,6% Natriumcitrat enthaltenden Spritze gewonnen, in die 0,9 ml Blut aufgezogen wurde. 4 Ansätze wurden bereitet:

Einfache Recalcifizierung: 0,05 ml Blut + 0,05 ml 0,37% $CaCl_2$ + 0,05 ml 0,85% NaCl.

Thromboplastinzusatz: 0,05 ml Blut + 0,05 ml 0,37% $CaCl_2$ + 0,05 ml Hirnthromboplastinsuspension (Behringwerke).

Thrombinzusatz: 0,05 ml Blut + 0,05 ml 0,85% NaCl + 0,05 ml Thrombin 1:1000.

Fibrinogenzusatz: 0,05 ml Blut + 0,05 ml 0,5% Fibrinogen in 0,85% NaCl + 0,05 ml 0,37% $CaCl_2$.

Die Austestung eines im Handel befindlichen gerinnungsfördernden Präparates („Reptilase") erfolgte weitgehend nach den Angaben der Hersteller: Etwa 1 ml Blut wurde durch Punktion der Ohrarterie gewonnen und sofort in ein kurzes Reagensglas übergeführt. Alle 10 sec wurde das sonst ruhig stehende Glas um etwa 60° schräg geneigt und die Zeit bestimmt, in der eine Verfestigung des Meniscus eintrat. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt.

Bestimmung der Allgemeintoxicität. Weiße Mäuse von 18–25 g erhielten 0,1 ml der zu prüfenden Lösung pro 10 g Körpergewicht injiziert und wurden 24 Std beobachtet.

Prüfung auf lokale Wirkungen bei intracutaner Injektion. Siehe Versuchsbeispiel S. 300.

Bradykininbildung und -zerstörung. Gleiche Teile eines bei —12° C aufbewahrten Rinderserums und Gift in Tyrodelösung (p_H 7,3) bzw. Phosphatpuffer (0,1 m, p_H 6,5) werden bei 37° C bebrütet und dann am isolierten Meerschweinchenileum getestet.

b) Enzymchemische Testverfahren. *Phospholipase A* wurde mit dem Dotterkoagulationsverfahren bestimmt (Habermann u. Neumann): 0,1 ml der zu testenden Lösung wurden zu 2 ml 40%iger Eigelbsuspension in 0,85% Kochsalzlösung gegeben, 1 Std bei 37°C gehalten und die Zeit bis zur kompletten Hitzekoagulation im siedenden Wasserbad bestimmt.

Hyaluronidase wurde viscosimetrisch erfaßt [vgl. Habermann (1)]: 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung wurden zu 0,4 ml Phosphat—Citrat-Puffer p_H 5,0 und 0,5 ml einer Hyaluronsäure (0,4%) —Kochsalz (0,85%)-Lösung gefügt und nach 15 min bei Zimmertemperatur die Viscositätsminderung gemessen.

Die Proteolyse wurde sowohl nach Pantlitschko, Kaiser u. Andres als auch nach dem von Holtz u. Raudonat benutzten Verfahren verfolgt. — Als noch empfindlicher erwies sich die Prüfung auf Gelatineverflüssigung: 0,1 ml zu testende Lösung wurden mit 1 ml 2%iger Gelatine (alba „Merck") in 0,43% Kochsalz enthaltendem 0,05 m Veronalpuffer p_H 7,2 3 Std bei 37° C gehalten, dann auf 10° C gekühlt und die Schwellenkonzentration der Verflüssigung abgelesen. Nach Kühlung auf Zimmertemperatur läßt sich der Viscositätsabfall ähnlich wie im Hyaluronidaseansatz bestimmen, die Viscosität steigt jedoch mit der Dauer der Abkühlung an.

Die Phosphodiesterase-Aktivität wurde photometrisch an Hand der Spaltung von Calcium- (bis -Paranitrophenylphosphat)$_2$ bestimmt (Privat de Garilhe u. Laskowski): 1 ml 0,1 m Veronalpuffer p_H 9,0 + 1,2 ml 0,001 m Substratlösung + 0,3 ml 0,3 m $MgSO_4$ + 0,5 ml Enzymlösung; 30 min bei 37° C; bei 440 mμ gegen enzymfreien Ansatz im Unicam-Spektrophotometer ausmessen.

Die *Adenosintriphosphatase*- und *Adenosinmonophosphatase*-Aktivität wurde bestimmt wie bei W. P. Neumann u. Habermann angegeben.

Das Prinzip unserer *l-Aminosäureoxydase*-Bestimmung beruht auf der Oxydation von Ferrocyanid durch das bei der Fermentreaktion entstehende Wasserstoffperoxyd: 0,5 ml 0,04 m Leucin in 0,2 m Phosphatpuffer p_H 7,2 + 0,5 ml Enzymlösung + 0,5 ml 0,01 m Kaliumferrocyanid wurden 90 min bei 37° C geschüttelt, 5 ml Wasser zugefügt und bei 420 mμ gemessen.

Bei sämtlichen enzymchemischen Reaktionen wurden täglich Eichkurven mit dem als Ausgangsmaterial benutzten Gift aufgestellt.

Ergebnisse

I. Anreicherung der thrombinartigen Komponente

Das von uns entwickelte Verfahren umfaßt drei Stufen: durch kurze Säurebehandlung wird der größte Teil der bisher bekannten Giftkomponenten weitgehend inaktiviert; das so vorbehandelte Material wird durch Acetonfällung fraktioniert; schließlich wird die thrombinartige Komponente durch Elektrophorese weiter gereinigt.

a) Säurebehandlung. Um die außerhalb der Problemstellung liegenden aktiven Bestandteile des Giftes durch selektive Denaturierung ausschalten zu können, wurde zwecks Festlegung optimaler Bedingungen zunächst die Temperatur- und Säurestabilität der verschiedenen Prinzipien geprüft. Eine 1—2%ige Giftlösung in Wasser wurde mit dem gleichen Volumen n/10 Salzsäure 15 min bei Zimmertemperatur bzw. bei 40, 50, 60, 70, 80 oder 98° C gehalten und dann mit Natriumbicarbonat-Pulver neutralisiert; der entstehende Niederschlag wurde nicht abzentrifugiert. Bereits bei Zimmertemperatur inaktivierte n/20 Salzsäure den größten Teil der untersuchten Faktoren in befriedigendem Ausmaß, während das thrombinähnliche Prinzip sich als relativ stabil erwies. Unter diesen Bedingungen fallen beim Neutralisieren etwa 18% des eingesetzten Giftmaterials aus, und in Lösung bleibt die in Tab. 1 angegebene Aktivität. Phosphatasen, Aminosäureoxydase und Hyaluronidase sind praktisch beseitigt und brauchen im weiteren Aufarbeitungsgang nicht mehr berücksichtigt zu werden.

b) Fraktionierte Fällung mit Aceton. Zur Trennung der säureresistenten Faktoren versuchten wir eine größere Zahl chromatographischer und Fällungsverfahren, von denen aber keines befriedigte, auch nicht das von Holtz u. Raudonat angegebene. Erst die wiederholte fraktionierte Fällung mit Aceton erlaubte die Entfernung inaktiven Materials und die Anreicherung von thrombinähnlichem und lecithinspaltendem Prinzip in verschiedenen Fraktionen.

Versuchsbeispiel. 390 mg Gift in 9,75 ml Wasser gelöst, 9,75 ml n/10 HCl zugesetzt, 15 min bei Zimmertemperatur. Mit festem $NaHCO_3$ neutralisiert, zentrifugiert, Bodensatz mit 3 ml Wasser nachgewaschen, vereinigtes Überstehendes mit 0,4 m Ammonacetat auf 40 ml aufgefüllt. In Eiswasser wird im Kälteraum (0° bis + 2° C) allmählich mit 0,4 Vol. Aceton versetzt, der Niederschlag nach etwa 1 Std abzentrifugiert (= I), das Überstehende 3mal mit je 0,25 Vol. Aceton (bezogen

Tabelle 1. *Aktivität und Ausbeute in verschiedenen Reinigungsstufen* (Ausgangsmaterial = 100%)

Stufe	Säure-behandlng		Aceton-Fraktion III_{III}		nach Elektrophorese	
Gewicht %	82		5		etwa 2,5	
Wirkung	rel.Akt. %	Ausb. %	rel. Akt. %	Ausb. %	rel. Akt. %	Ausb. %
Fibrinogen-Koagul.	98	80	600	30	1000—1200	25—30
Gesamtblut-Koagul.			12,5	0,63	s. Abb. 2	
Prothrombinaktiv.					s. Tab. 4	
Allgemeintoxicität						
i.v.	9,7	8	etwa 13	etwa 0,65	etwa 15	etwa 0,4
s.c.			etwa 20	etwa 1		
Permeabilitätserh.					s. Tab. 8	
Hämorrhagie						
Spreading						
Gelatineverflüssig.	etwa 6	etwa 5	etwa 60	etwa 3	etwa 100	etwa 3
Hämoglobinspaltung			6	0,3	< 1,5	< 0,04
Phospholipase A	122	100	< 12,5	< 0,6	3	0,08
Hyaluronidase	< 3	< 3			< 3	< 0,08
Aminosäureoxydase	< 3	< 3				
Adenosintriphosphatase	< 3	< 3				
Adenosinmonophosphatase	< 3	< 3				
Phosphodiesterase	< 3	< 3				

Tabelle 2. *Erste Acetonfällung von säurebehandeltem Jararacagift*

Fraktion	Gewicht	Ausbeute		Relative Aktivität	
		Koagulase	Phospholipase	Koagulase	Phospholipase
	%[1]	%	%	%	%
I	12	2	2	17	17
II	22	11	4	50	18
III	11	46	3	420	27
IV	9,5	19	2	200	21
Summe	54,5[2]	78	11[3]		

[1] Gesamtgift = 100.

[2] Von den übrigen 45,5% sind 18% unlöslich, der Rest zusammen mit Salzen im letzten Überstehenden verblieben.

[3] Der Rest befindet sich im letzten Überstehenden.

auf das jeweilige Gesamtvolumen des Überstehenden der vorhergehenden Fällung) versetzt (= II, III und IV), das letzte Überstehende im Vakuum eingeengt und gefriergetrocknet.

Die Aktivität und Reinheit der Präparate läßt sich durch eine zweite Acetonfällung von III und IV noch erhöhen. Bringt man z. B. 42 mg III in 8 ml 0,01 m NH_4-Acetat, zentrifugiert das Unlösliche ab und setzt zunächst 6, dann 3 und 5 ml Aceton bei 0° C zu und trennt jeweils nach 1 Std den Niederschlag ab, so verhalten sich die Unterfraktionen gemäß Tab. 3.

Tabelle 3. *Zweite Acetonfällung*

Fraktion	Gewicht	Ausbeute[1]		Relative Aktivität[2]	
		Koagulase	Phospholipase	Koagulase	Phospholipase
	% [1]	%	%	%	%
III_{II}	30	11	< 15	150	< 12,5
III_{III}	43	62	< 21	600	< 12,5
III_{IV}	9	3	27	150	etwa 80
Summe	82	76			

[1] III = 100%.
[2] Gesamtgift = 100%.

Bei einer zweiten Giftcharge, welche sich gegenüber der Säurebehandlung ähnlich verhielt, war durch die Acetonfällung eine noch stärkere Anreicherung des koagulationsfördernden Prinzips zu erzielen, die Abtrennung von Phospholipase A gelang jedoch weniger gut. Die thrombinähnliche Wirkung war in Fraktion III_{III} 10 mal größer als beim Gesamtgift, die Phospholipase-Aktivität entsprach der des Gesamtgifts.

c) Präparative Elektrophorese. In der von Grassmann u. Hannig angegebenen Apparatur zur kontinuierlichen Elektrophorese erwiesen sich auch die koagulasereichsten, durch Acetonfällung gewonnenen Fraktionen als unheitlich. Die Elektrophorese in der Stärkeplatte [analog dem bei Habermann (2) beschriebenen Verfahren] war auch bei Modifizierung der Bedingungen nach den verschiedensten Richtungen bei Verwendung von gereinigtem Material zu verlustreich. Wir blieben daher bei dem von Grassmann u. Hannig beschriebenen Verfahren, obwohl seine Trennschärfe begrenzt war.

Versuchsbeispiel. Eine „kleine" Elphor V-Apparatur wurde bei 300 V (= etwa 12,5 V/cm) und etwa 14—15 Milliamp. mit 0,033 m Veronal—Salzsäure-Puffer äquilibriert, die Tropfgeschwindigkeit so eingestellt, daß eine nicht adsorbierte Substanz das Papier binnen 3 Std durchwanderte. 19 mg eines im Vergleich zum Ausgangsmaterial 6fach aktiveren, durch fraktionierte Acetonfällung gewonnenen Präparates wurden in 0,76 ml Puffer aus einer Tuberkulinspritze mittels eines Heuwing-Infusionsapparates binnen 7 Std auf das Papier gebracht und der Versuch weitere 4 Std fortgesetzt. Die aktivsten, langsam anodisch wandernden Fraktionen wurden vereinigt, etwa 14 Std unter Rühren durch Cellophan gegen 0,025 m Ammonacetat dialysiert, durch Gefriertrocknung auf 1,7 ml eingeengt

und mit dem doppelten Volumen Aceton gefällt. Wie Vorversuche mit gereinigtem Material zeigten, tritt durch Dialyse und Gefriertrocknung kein Wirkungsverlust ein. Erhalten wurden 9,75 mg mit der 12fachen Aktivität des Ausgangsmaterials, was einer Ausbeute von 102% entsprechen würde. Es fiel auf, daß (vgl. Tab. 1) mit der Anreicherung der Koagulaseaktivität ein starker Zuwachs der gelatinolytischen Fähigkeit des Präparates einherging (von 6% nach Säurebehandlung auf 100% nach elektrophoretischer Reinigung).

Eine gleich befriedigende Trennung von Phospholipase und thrombinähnlicher Wirkung gelang nicht bei allen Giftchargen. Bei der oben

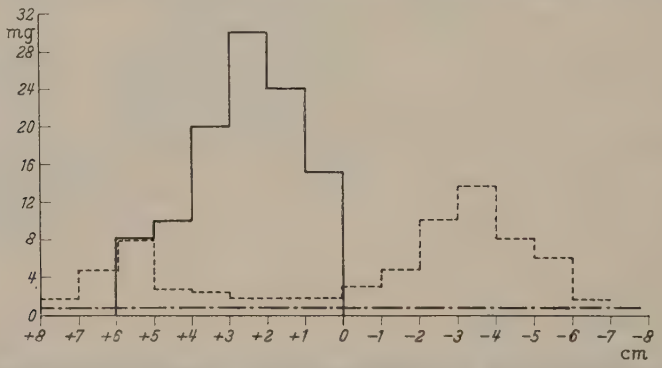


Abb. 1. *Zonenelektrophorese in Stärke von 100 mg Jararacagift (zweite Charge).* Bedingungen: s. Text. Ordinate: Aktivitätsäquivalente/Fraktion, bezogen auf Milligramm Gesamtgift; Abszisse: Segmente der Stärkeplatte. Anodische (+) und kathodische (—) Distanz vom Startpunkt (0) in Zentimetern ——— Fibrinogen-Gerinnung; ------ Dotterkoagulationshemmung; —·—·— Nachweisbarkeitsgrenze

bereits erwähnten zweiten Giftcharge war in der letzten Stufe auch nach einer Elektrophorese unter den angegebenen Bedingungen die Restaktivität an Phospholipase nicht von der Koagulase getrennt. Bei Zonenelektrophorese von Gesamtgift in Stärkeplatten fanden sich zwar unter bestimmten Bedingungen die Maxima von Koagulase- und Phospholipaseaktivität an verschiedenen Stellen; dabei bildeten sich — noch deutlicher als bei der Elphor V-Elektrophorese — zwei Maxima der Dotterkoagulationswirkung aus (Abb. 1). Versuchte man aber das durch Elektrophorese in der Elphor V-Apparatur gereinigte Material auf der Stärkeplatte weiter zu reinigen, so ließ sich nur ein Teil der Phospholipase-Aktivität abtrennen; der Rest haftete hartnäckig an der Koagulase-Fraktion. Immerhin ließ sich durch Kombination der beiden elektrophoretischen Verfahren aus dieser zweiten Giftcharge ein Material gewinnen, welches pro Gewichtseinheit (bei 45% Ausbeute an Substanz bezüglich des eingesetzten, durch Fällung gereinigten Materials) nur noch ein Viertel der Phospholipaseaktivität, aber die 10fache Koagulasewirkung im Vergleich zu Gesamtgift besaß.

Versuchsbeispiel (Abb. 1). Auf einer mit fließendem Leitungswasser (etwa 10° C) gekühlten Glasplatte wurde durch etwa 4 mm hohe Kunststoffstreifen ein 33 cm langer Trog gebildet, dessen Breite der zu trennenden Substanzmenge angepaßt

wurde. Platinelektroden reichten in puffergefüllte Cuvetten an den Schmalseiten des Stärketrogs. Nach Eingießen eines Breies aus gewaschener Stärke und Puffer (0,1 m Veronalpuffer p_H 8,6 mit 0,2 m NaCl) und Abtupfen der überstehenden Flüssigkeit wurde ein etwa 5 mm breiter Graben quer durch die Mitte der Stärkeplatte gelegt und die mit trockener Stärke angerührte Giftlösung eingestrichen. Die gifthaltige Region wurde mit einer etwa 2 mm dicken Schicht erkalteten Paraffins geschützt. Die Verbindung mit den Elektrodengefäßen wurde durch je zwei übereinanderliegende Streifen aus kartonartigem Filterpapier hergestellt und die Stärkeplatte mit Ausnahme des bereits bedeckten gifthaltigen Bereichs mit niedrigschmelzendem (etwa 45° C) Paraffin übergossen. Eine derartige Schutzschicht erstarrt sehr schnell und kann nach Ende des Stromdurchganges (8 Std, 200V) glatt abgehoben werden. Die Stärkeplatte wurde schließlich in 1 cm-Abschnitte zerlegt, in Zentrifugengläser gefüllt, 2 mal mit je 6 ml 0,85% Kochsalzlösung geschüttelt und durch Zentrifugieren geklärt.

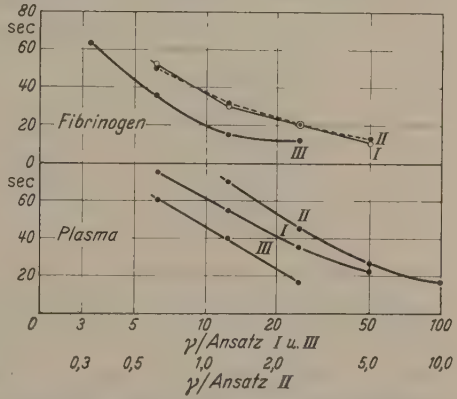


Abb. 2. *Koagulation von Fibrinogen und Plasma unter dem Einfluß von Bothrops-Jararacagift (I): thrombinähnlicher Giftkomponente (II) und Thrombin (III).* Bedingungen siehe Methodik. Ordinate: Gerinnungszeit in Sekunden; Abszisse: γ der jeweiligen gerinnungsaktiven Komponente/Ansatz

II. Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des gereinigten Materials

Im Vordergrund des Interesses steht die Wirkung auf die Blutgerinnung. Vergleicht man (Abb. 2) die Aktivität von gereinigtem Thrombin, Gesamtgift und der daraus gewonnenen thrombinähnlich wirkenden Fraktion *in vitro*, so fällt zunächst auf, daß alle drei gereinigtes Fibrinogen schneller zur Gerinnung bringen als Citratplasma. Im Ansatz mit Fibrinogen ist das hier verwendete gereinigte Material rund 10mal wirksamer als Gesamtgift und etwa 5mal wirksamer als gereinigtes Thrombin (40 E/mg enthaltend). Wir erzielten jedoch auch Chargen, die 12mal aktiver als das Ausgangsmaterial waren. In den Ansätzen mit Plasma ist der Unterschied zwischen Gesamtgift und gereinigter „Koagulase" weniger stark, möglicherweise deshalb, weil jetzt eine prothrombinaktivierende Komponente des Gesamtgiftes in Erscheinung tritt, die in gereinigtem Material nicht nachweisbar ist (Tab. 4).

Das p_H-Optimum liegt für Gesamtgift ebenso wie für Thrombin um p_H 6,8 (Abb. 3).

In vivo fanden wir weder an der Maus noch am Kaninchen eine eindeutige „positive Phase" der Blutgerinnung. Injiziert man z. B. der weißen Maus 0,1 ml/10 g einer Lösung der „Koagulase"-Fraktion 1:10000 bzw. 1:100000 i.v., so ist ihre Blutungs- und Gerinnungszeit nach 15—45 min auf mehr als das Doppelte verlängert, während nach

Tabelle 4. *Wirkung von Gesamtgift und gereinigter Koagulase auf die Thrombinbildung* Ansätze: 0,5 ml Citratplasma (mit 16 Teilen Veronalpuffer p_H 6,8 und 4 Teilen 3,8% Natriumcitrat verdünnt) + 0,5 ml Giftverdünnung der angegebenen Konzentrationen in Albumin (0,1%)-Kochsalz (0,85%)-Lösung; bei 37° C halten. Alle 5 min 0,1 ml zu 0,1 ml Fibrinogen (0,5%)-Kochsalz (0,85%)-Lösung + 0,1 m Veronalpuffer p_H 6,8 geben. Gerinnungszeit in Sekunden bei 37° C.

	Citratplasma mit Gift bebrütet		
	0 min	5 min	10 min
Gesamtgift			
1: 25000	120	110	80
1: 50000	170	170	120
1:100000	>180	>180	>180
Koagulase			
1: 80000	65	65	65
1:160000	>180	>180	>180

Verdünnungen von 1:1 Million keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Norm bestehen. Die verminderte Gerinnungsbereitschaft ist durch Fibrinogenmangel bedingt, da Zusatz von Fibrinogen, nicht aber von Thrombin oder Gewebsthromboplastin, die Gerinnung normalisiert. In dieser Hinsicht entspricht die Wirkung des koagulierenden Faktors der von Jararaca-Gesamtgift (vgl. Tab. 5). Am Kaninchen finden sich grundsätzlich ähnliche Verhältnisse (vgl. Tab. p6), wenn sich vielleicht auch kurz nach Injektion des koagulationsfördernden Prinzips eine schwache (nicht sicher signifikante) positive Phase findet, die aber später in eine negative umschlägt.

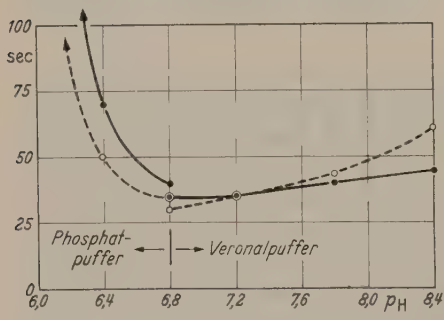


Abb. 3. *p_H-Abhängigkeit der Fibrinogengerinnung durch Thrombin und Jararacagift.* Bedingungen: s. Methodik. Ordinate: Gerinnungszeit (sec); Abszisse: p_H. —— Thrombin; ------ Jararacagift. Unterhalb p_H 6,8 wurde 0,1 m Phosphatpuffer, der mit 0,1 m NaCl 1:1 verdünnt war, verwendet, oberhalb dagegen in gleicher Weise verdünnter Veronal-Salzsäure-Puffer

Holtz u. Raudonat fanden Gerinnungsförderung in vivo zusammen mit Prothrombinaktivierung und relativ starker Proteolyse in derselben Fraktion, während die thrombinähnlich wirkende keine Gerinnungsbeschleunigung in vivo hervorrief. Unsere Befunde liegen in der gleichen Richtung mit dem Unterschied, daß wir auch mit Gesamtgift keine signifikante Koagulationsbeschleunigung in vivo erzielten, sondern in den wirksamen Dosen nur Fibrinogenverarmung. Ob dies an der Art der Applikation (Holtz u. Raudonat injizierten i.m., wir i.v.) oder an den benutzten Giftchargen liegt, muß wohl vorläufig offen bleiben.

Der thrombinähnliche Faktor aus Jararacagift erscheint nach diesen Ergebnissen als systemisch anzuwendendes Hämostyptikum nicht brauchbar. Nun sind aber seit Jahrzehnten Präparate aus diesem Gift

Tabelle 5. *Gerinnungs- und Blutungszeit an der weißen Maus*

	Gerinnungsz. (sec)	Blutungsz. (sec)	n. Recalcifizierung	n. Thromboplastin	n. Thrombin	n. Fibrinogen
Normal	209 ($\sigma = 45$)[1]	184 ($\sigma = 52$)[2]	105	8	7	75
Koagulase						
1: 10000	>420	>360				
1: 100000	>420	390	>360	>360	>360	50
	>540	>360				
	>540	570				
1:1000000			70	7	25	90
Jararacagift						
1: 10000	>360 (4 Tiere)	>360 (4 Tiere)	>360	>300	>300	55
1: 50000	>480 (3 Tiere)	>360 (3 Tiere)				
1: 100000	>360	380				
1: 250000	>300 (3 Tiere)	305, 340, 305				
1:1000000	180	340				
1:5000000	175, 225, 170	350, 220, 330				

[1] Werte aus Einzelbestimmungen an 11 Tieren.
[2] Werte aus Einzelbestimmungen an 36 Tieren.

Tabelle 6. *Gerinnungszeit des Kaninchens*

	n. Recalcifizierung	n. Thromboplastin	n. Thrombin	n. Fibrinogen
	a) 1 mg/kg Jararacagift i.v. (Tier starb kurz nach Injektion)			
Vor Injektion	135	20	8	80
Nach Injektion	>300	>300	>300	50
	b) 0,1 mg/kg thrombinähnliches Prinzip i.v.			
Vor Injektion	150	15	8	75
15 min nach Injektion	105	8	8	75
75 min nach Injektion	>300	>300	>300	70

im Handel, deren klinische Brauchbarkeit allerdings verschieden beurteilt wird (vgl. z. B. Deutsch). Wir hatten Gelegenheit, ein derartiges Präparat („Reptilase") zu untersuchen, wobei wir uns streng an die vom Hersteller angegebene, relativ primitive Testmethodik hielten. Das Ergebnis kann, auch nach der 10fachen der angeblich wirksamen Dosierung, nicht als positiv bezeichnet werden (Tab. 7).

Mit einer *LD 50* um 15 mg/kg i.v. Injektion an der weißen Maus ist unsere gereinigte Fraktion 6—7mal weniger giftig als das Ausgangsmaterial. Die Tiere sterben zum Teil wenige Minuten nach Injektion

unter charakteristischen, auch nach Thrombininjektionen beobachteten (Seegers) Rollbewegungen um die Längsachse, die allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Wird dieses perakute Stadium überlebt, so kann in den nächsten Stunden der Tod unter schweren Blutverlusten aus Darm- und Urogenitaltrakt eintreten. Bei der Sektion wurden makroskopisch keine Thromben gefunden; das Blut war ungerinnbar.

Tabelle 7. *Gerinnungszeit des Kaninchens nach Reptilase*

ml/kg i.m.	Gerinnungszeit (sec)		
	Vorprobe	20—40 min n. Inj.	24 Std n. Inj.
0,014	90, 80	80, 90	100, 100
0,014	45, 45	40, 40	180, 170
0,14	85, 90	65, 85	65, 80
0,14	60, 75	95, 70	70, 80

Bei der Prüfung auf *lokale Wirkungen* am Kaninchenrücken fanden wir keinen spreading-Effekt oder Hämorrhagie, wohl aber eine mit der Koagulaseaktivität zunehmende Permeabilitätserhöhung für i.v. injizierten Farbstoff. Trotz der infolge der subjektiven Ablesung begrenzten Genauigkeit war das Ergebnis wiederholt zu reproduzieren. Es ist natürlich denkbar, daß das thrombinähnliche Prinzip direkte Gefäßwirkungen

Tabelle 8. *Lokale Wirkungen am Kaninchenrücken*

	Gesamtgift						thrombinähnliches Prinzip					
	Permeab.		Spreading		Hämorrh.		Permeab.		Spread.		Hämorrh.	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1: 10000	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	0	0	0	0
1: 50000	+++	+++	+++	+++	(+)	0	+++	+++	0	0	0	0
1: 250000	+	+++	+	++	0	—	+++	+++	0	0	0	0
1:1250000	(+)	+	0	—	—	—	++	+++	0	0	0	0
1:6250000	0	0	0	—	—	—	+	+	0	0	0	0

besitzt (die dem Thrombin fehlen, wie Vergleiche zeigten). Diese Gefäßwirkung könnte auch mit seiner Fähigkeit zur Bradykininfreisetzung (siehe unten) zusammenhängen; doch ist auch eine gleichzeitige Anreicherung eines spezifischen Permeabilitätsfaktors diskutabel.

Versuchsbeispiel. Der Rücken von 2 Kaninchen (a und b) wird mit der Schere kurz geschoren. Quaddeln mit 0,1 ml der jeweiligen Giftkonzentration werden in möglichst kurzer Zeit gesetzt, und zwar die einander entsprechenden Konzentrationen der zu vergleichenden Substanzen symmetrisch aufgebracht. Dann wird 5 mg/kg Tier Evansblue in filtrierter 0,5%iger Lösung mit 0,85% Kochsalz in die Ohrvene gespritzt (vgl. Tab. 8).

Die *Bradykininbildung und -zerstörung* durch gerinnungsaktive Komponenten von Jararacagift wurde bereits von Holtz u. Raudonat eingehend untersucht. Auch unsere Koagulasefraktion setzte im schwach Sauren (p_H 6,5) stärker Bradykinin frei als im schwach Alkalischen (p_H 7,3). Sie war nicht vollständig frei von bradykininzerstörenden Fähigkeiten. Kleine Konzentrationen (0,5 γ/ml) führten zwar binnen 1 Std weder bei p_H 6,5 noch bei p_H 7,3 zu sichtbarer Bradykininzerstörung; hohe Dosen (50 γ/ml) zerstörten jedoch das zunächst gebildete Bradykinin später fast vollständig (vgl. Abb. 4). Die Schwellenkonzentration für die Bradykininbildung lag bei unserer gereinigten Fraktion 5—10 mal tiefer (bei etwa 0,1 γ/ml) als beim Ausgangsmaterial.

Abb. 4. *Bradykininbildung und -abbau durch das thrombinähnliche Prinzip.* Isolierter Meerschweinchendünndarm, 20 ml fassendes Bad, Zeitschreibung 12 sec. a *1* 0,5 ml thrombinähnliches Prinzip 1:10000; *2* 1 ml einer Mischung 1:1 aus Rinderserum und thrombinähnlichem Prinzip 1:10000 in Tyrodelösung (p_H 7,3), sofort nach Vereinigung; *3* 0,5 ml Serum; *4* wie *2*, aber 10 min vorbebrütet (37° C); *5* 0,3 γ Histamin; *6* 0,03γ Histamin. b *1* 0,5 ml einer Rinderserum—Phosphatpuffer-Mischung 1:1 (p_H 6,5); *2* 0,5 γ Histamin; *3* 0,5 ml einer Mischung 1:1 aus Rinderserum und thrombinähnlichem Prinzip 1:1000000 in Puffer, sofort nach Vereinigung; *4* wie *3*, aber 12 min vorbebrütet; *5* wie *3*, 40 min vorbebrütet; *6* wie *3*, 70 min vorbebrütet

Zwischen *proteolytischem Vermögen* und thrombinähnlicher Wirkung bestehen, wie wir ebenso wie Holtz und Raudonat beobachteten, zunächst keine strengen Zusammenhänge. Säurebehandlung schädigt das proteolytische Vermögen von Gesamtgift viel stärker als seine thrombinähnliche Wirkung. Jedoch ist auffallend, daß bei den folgenden Reinigungsschritten die verbleibende gelatinolytische Aktivität mit der thrombinähnlichen zunahm (vgl. Tab. 1).

Zusammenfassung

Das thrombinähnlich wirkende Prinzip aus dem Gift von Bothrops jararaca wurde durch Kombination von Denaturierungs-, Fällungs- und Elektrophoreseverfahren bis zu 12fach angereichert. Dabei fielen die meisten untersuchten anderen biochemischen und pharmakologischen Wirkungen des Giftes stark ab. Lediglich zu Proteolyse, Permeabilitätserhöhung und Bradykininfreisetzung bestehen möglicherweise noch Beziehungen. Die Gerinnungs- und Blutungszeit von mit diesem Prinzip behandelten Tieren war verlängert, was (zum mindesten weitgehend) auf Fibrinogenmangel zurückgeführt werden konnte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

Literatur

Deutsch, E.: „Blutgerinnungsfaktoren", S. 208—217. Wien 1955.

Grassmann, W., u. K. Hannig: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **292**, 32 (1953).

Habermann, E.: (1) Biochem. Z. **329**, 1 (1957). — (2) Biochem. Z. **329**, 405 (1957).

Habermann, E., u. W. Neumann: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **297**, 179 (1954).

Holtz, P., u. H. W. Raudonat: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 113 (1956).

Neumann, W. P., u. E. Habermann: Biochem. Z. **327**, 170 (1955).

Pantlitschko, M., E. Kaiser u. H. Andres: Biochem. Z. **322**, 526 (1952).

Privat de Garilhe, M., and M. Laskowski: Biochim. biophys. Acta **18**, 370 (1955).

Seegers, W. H.: Pharmacol. Rev. **3**, 320 (1951).

Priv.-Doz. Dr. E. Habermann,
Pharmakologisches Institut der Universität Würzburg, Koellikerstr. 2

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 303—310 (1958)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Diwag Chemische Fabriken AG, Berlin-Waidmannslust

Stimulierung vegetativer Ganglien durch p-Brom-Benzyltrimethylammoniumbromid*

Von

KARL CREDNER

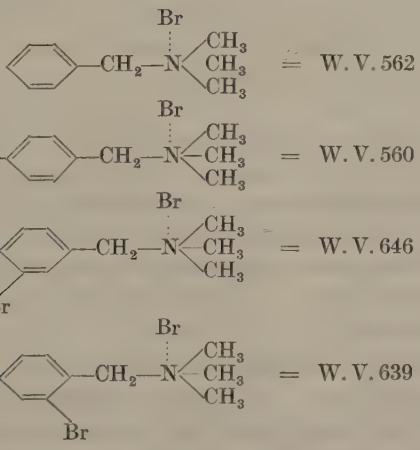
Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. März 1958)

Vergleichende Untersuchungen mit Abkömmlingen des Benzyltrimethyl-ammoniumbromid (WV 562) (CREDNER, KAWAN u. KRÜGER) hatten ergeben, daß am Ring halogenierte Verbindungen je nach Stellung des Substituenten interessante pharmakologische Unterschiede aufwiesen:

Die in meta- und ortho-Stellung bromierten Körper WV 646 und WV 639 wirkten muscarinartig wie die Ausgangssubstanz WV 562. Die meta-Substitution führte zu einer Steigerung, die ortho-Substitution dagegen zu einer Abnahme der Wirksamkeit. Die in para-Stellung halogenierte Verbindung WV 560 besaß nicotinähnliche Eigenschaften.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über Versuche mit der Substanz WV 560.



* Über die Ergebnisse wurde auszugsweise bereits auf der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Bonn 1953 berichtet.

Methodik

Die Blutdruckversuche wurden an Katzen und an Hunden durchgeführt, die mit Pernocton ad usum veterinarium (0,8 cm³ der 10%igen Lösung/kg) oder mit Chloralose (60 mg/kg) und Urethan (250 mg/kg) narkotisiert waren. Blutdruckregistrierung aus der Arteria femoralis mittels Marayscher Kapsel oder eines Quecksilbermanometers. Alle Injektionen erfolgten in die Vena jugularis. In einigen Versuchen zeichneten wir gleichzeitig das Darmvolumen in situ nach Straub auf. Blutzuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen bei nicht narkotisierten Kaninchen und bei Katzen in Pernocton-Narkose. Versuche am isolierten Darm nach der Methode von Magnus, am isolierten Froschherz in den Monaten August bis Oktober nach der Methode von Straub. Kaninchenohren wurden nach der Methode von Krakow-Pissemski durchströmt unter Verwendung des Ausflußmessers von Stephenson.

Ergebnisse

1. Die Wirkung des WV 560 auf Kreislauf und Atmung. WV 560 verursacht in Dosen bis zu 50 γ/kg einen geringfügigen Blutdruckabfall, Dosen ab 70 γ/kg rufen auch bei nicht atropinisierten Katzen und Hunden einen Blutdruckanstieg hervor (Abb. 1). Die Wirkung ist dosisabhängig. 150—170 γ/kg wirken maximal. Verschiedentlich beobachteten wir nach wiederholten Injektionen der gleichen Dosis eine Zunahme der Wirksamkeit, niemals aber trat eine Tachyphylaxie in Erscheinung. Atropin (1—2 mg/kg s.c.) verstärkt den pressorischen Effekt. Bei Katzen ist die Blutdrucksteigerung von einer Tachykardie begleitet, der bei Hunden eine Bradykardie unter Reduktion der Herzfrequenz bis zu 50% vorangeht.

Während der durch WV 560 bedingten Blutdrucksteigerung kommt es zu einer kurzdauernden Beschleunigung der Atmung; höhere Dosen (250 γ/kg) führen zu einer Vertiefung und Verlangsamung der Atmung. Nach 280—300 γ/kg tritt Atemstillstand ein, der bei gleichzeitigem sekundären Blutdruckabfall unter Muskelfibrillation sowohl bei Katzen als auch bei Hunden zum Tode führt, wenn nicht künstliche Atmung eingeleitet wird.

10—20 mal höhere Dosen von WV 646 (m-Br-derivat), als zur Erzeugung muscarinartiger Symptome benötigt werden, wirken nach Atropin ebenfalls blutdrucksteigernd. Das gilt nicht für die ortho-Verbindung (WV 639). Die somit auch der meta-Verbindung zukommende nicotinartige Wirkungskomponente überwiegt offenbar bei der para-Verbindung so sehr die muscarinartige, daß WV 560 schon am nichtatropinisierten Tier pressorisch wirkt.

2. Adrenergischer Charakter der Wirkung des WV 560. a) In 8 Versuchen an Hunden und 4 Versuchen an Katzen kam es nach einer pressorischen Dosis von WV 560 bei gleichzeitiger Registrierung des Darmes in situ nach Straub zu einer Darmlähmung, wie sie auch nach Adrenalin auftritt (Abb. 2). Selbst noch nicht pressorisch wirksame

Dosen verursachten eine deutliche Verminderung des Darmtonus. Die darmhemmende Wirkung des WV 560 liegt bei Vergleich äquipressorischer Dosen zwischen dem Adrenalin- und Noradrenalineffekt; Ganglienblocker verhindern sie.

b) An der Nickhaut der Katze löst WV 560 ab 100 γ/kg eine Kontraktion aus, die von einer Pupillenerweiterung und Protrusio bulbi begleitet ist.

c) An Katzen in Pernocton-Narkose verglichen wir die hyperglykämische Wirksamkeit äquipressorischer Dosen von Adrenalin, Noradrenalin und WV 560, nachdem wir zuvor festgestellt hatten, daß

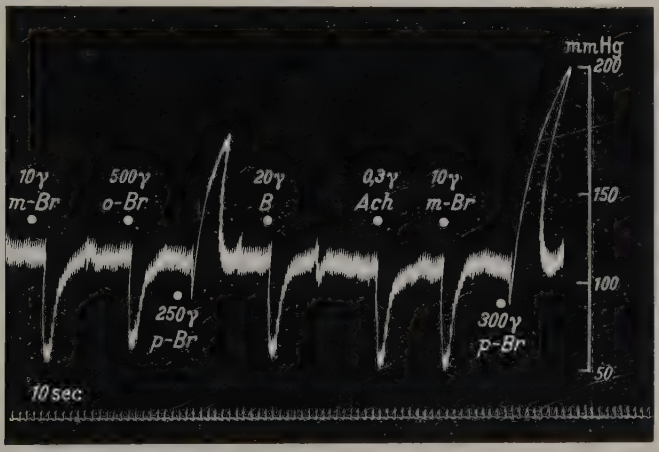


Abb. 1. Wirkung der drei Isomeren WV 646, 639 und 560 am Katzenblutdruck im Vergleich mit Acetylcholin. Katze 3 kg (Chloralose-Urethan-Narkose). *m-Br* meta-Brombenzyltrimethylammoniumbromid (WV 646); *o-Br* ortho-Brombenzyltrimethylammoniumbromid (WV 639); *p-Br* para-Brombenzyltrimethylammoniumbromid (WV 560); *B* Benzyltrimethylammoniumbromid (WV 562); *Ach* Acetylcholin

WV 560 im Bereich von 80—100 γ/kg ungefähr 30mal schwächer pressorisch wirkt als Adrenalin. In 4 Versuchen unter gleichzeitiger Blutdruckkontrolle erreichte der Blutzuckerspiegel nach WV 560 dieselbe Höhe wie nach einer äquipressorischen Adrenalindosis; eine pressorisch sogar wirksamere Noradrenalindosis war infolge der ungefähr 10fach schwächeren glykämischen Wirkung dieses Amins (Holtz u. Schümann, Credner, Krüger u. Neugebauer) unwirksam.

An Kaninchen verursachten direkt an der Krampfschwelle liegende Dosen (1 mg/kg WV 560 i.v.) ebenfalls eine Hyperglykämie, kleinere Dosen waren wirkungslos. Durch Ganglienblocker ließ sich die Hyperglykämie vollkommen verhindern.

d) Eine Yohimbindosis, die den blutdrucksteigernden Adrenalin-Effekt umkehrt und den Noradrenalin-Effekt abschwächt, reduziert ebenfalls den Blutdruckanstieg nach WV 560.

3. Nicotinartiger ganglionärer Wirkungscharakter des WV 560. Als Ganglienblocker verwandten wir neben N,N,N′,N′-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-aza-penthylen-1,5-diammonium-dibromid[1], eine bisher noch nicht beschriebene Verbindung (Bis-[β-dimethylamin-äthyl]-sulfid-bis-

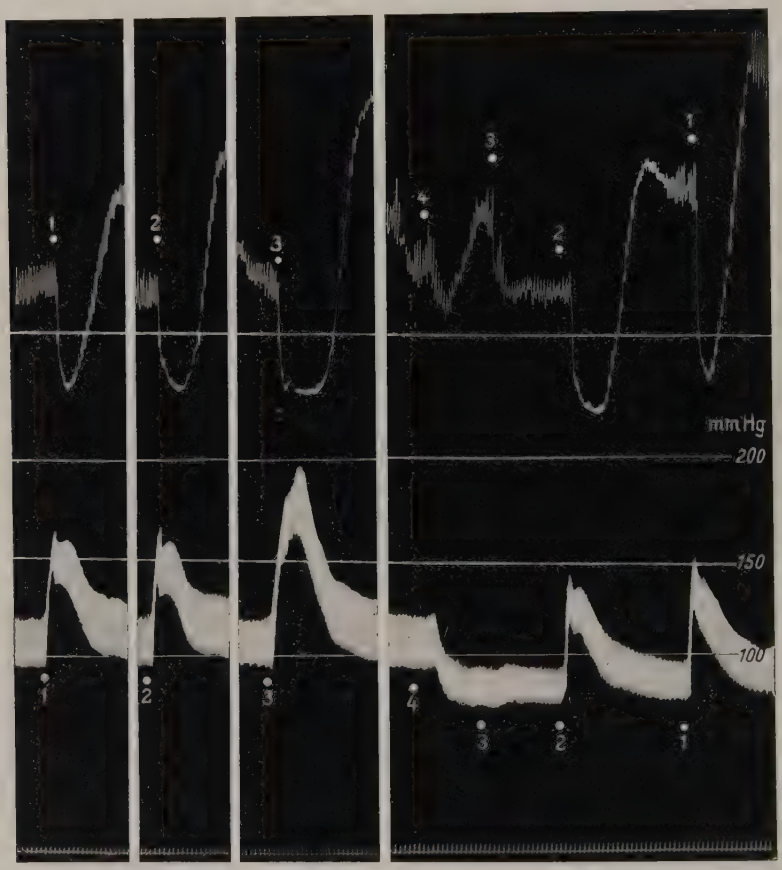


Abb. 2. Aufhebung der Blutdruck- und Darmwirkung des WV 560 durch einen Ganglienblocker. Hund 6 kg, Pernoctonnarkose. Obere Kurve: Darm in situ nach Straub; mittlere Kurve: Blutdruck in der Arteria femoralis; untere Kurve: Zeitschreibung, 10 sec. *1* 10 γ Noradrenalin; *2* 10 γ Adrenalin; *3* 1 mg WV 560; *4* 10 mg/kg Ganglienblocker (WV 640)

methobromid = WV 640), deren Eignung wir in Versuchen an der Katzennickhaut mit prä- und postganglionärer Reizung des Halssympathicus nachgewiesen hatten. Die Injektion des Ganglienblockers verhindert ähnlich wie in den Blutzuckerversuchen die glykämische, so jetzt in Versuchen an Katze und Hund die pressorische, tachykarde und

[1] Pendiomid (Wz).

darmhemmende Wirkung des WV 560, während die Adrenalin- und Noradrenalin-Wirkung erhalten bleibt (Abb. 2). Der ganglionär erregende Effekt des WV 560 erstreckt sich auch auf die Nebennieren, da seine blutdrucksteigernde Wirkung nach Adrenalektomie um ungefähr 50% vermindert ist (Abb. 3).

Am isolierten Darm ließ sich die nicotinartige Wirkungskomponente des WV 560 ebenfalls demonstrieren. An einem frischen Stück Meerschweinchenrectum oder Kaninchendünndarm wird die durch WV 560 (10^{-5}) ausgelöste Kontraktion nur zum Teil durch Atropin ($10^{-6,6}$) aufgehoben. Der atropinresistente Rest verschwindet bei Zusatz eines

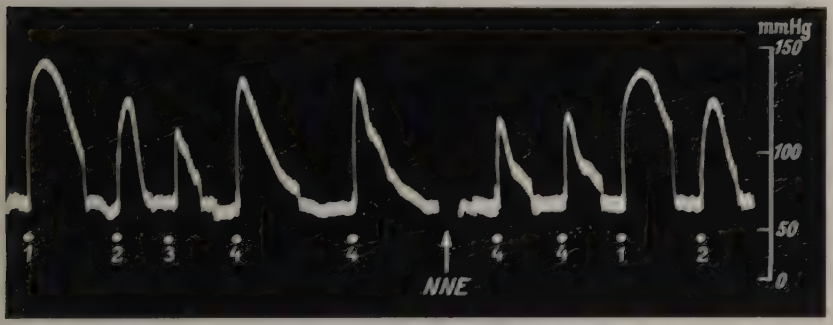


Abb. 3. Einfluß der Nebennierenentfernung auf den pressorischen Effekt des WV 560. Katze 2,5 kg (Chloralose-Urethan, Atropin, sulf. 2 mg/kg). *1* 10 γ Noradrenalin; *2* 10 γ Adrenalin; *3* 150 γ WV 560; *4* 300 γ WV 560. ↑ *NNE* 60 min nach Nebennierenentfernung

Ganglienblockers. Demgegenüber werden an gelagerten, z. B. über Nacht im Eisschrank aufbewahrten Darmstücken, sowie am frischen Meerschweinchenileum die durch WV 560 verursachten Kontraktionen von Atropin vollkommen aufgehoben. Die für die nicotinartige, atropinresistente, aber gegen Ganglienblocker empfindliche Erregungswirkung in Frage kommenden — „ganglionären" — Strukturen sind offenbar in den oberen Abschnitten des Meerschweinchendarmes (Ileum) nicht in ausreichender Zahl vorhanden und gehen im Meerschweinchenrectum und im Kaninchendarm bei Lagerung zugrunde, so daß dann nur die muscarinartige, atropinempfindliche Wirkungskomponente des WV 560 zur Geltung kommt.

4. Die Wirkung des WV 560 auf das isolierte Froschherz. Die nicotin- und muscarinartige Wirkung läßt sich auch am Froschherz beobachten. Versuche an insgesamt 35 Herzen hatten folgende Ergebnisse. An Herzen, die besonders adrenalinempfindlich waren, verursachte WV 560 eine ausgesprochen positiv inotrope und chronotrope Wirkung, die durch Ganglienblocker aufgehoben wurde (Abb. 4a). Bei Herzen mit großen und kräftigen Kontraktionen, die wenig adrenalinempfindlich, aber sehr

acetylcholinempfindlich waren, verursachte WV 560 eine muscarinartige Abschwächung der Amplitude bis zum vollkommenen Herzstillstand, die sich durch Atropin verhindern bzw. aufheben ließ.

Besonderes Interesse beansprucht folgende Beobachtung. Einige Herzen reagierten zunächst auf WV 560 überhaupt nicht. Ließ man auf diese Herzen eine kleine Adrenalindosis einwirken, so übte nach dem Abklingen der Adrenalinwirkung die vorher wirkungslose WV 560-Dosis

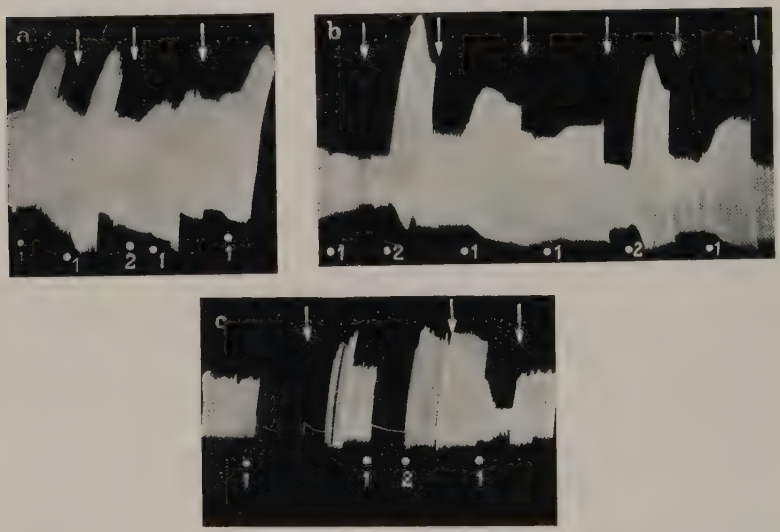


Abb 4a—c. WV 560 am isolierten Froschherzen. a *1* 200 γ WV 560, *2* 500 γ Ganglienblocker (WV640); b *1* 200 γ WV 560, *2* 0,04 γ Adrenalin; c *1* 0,01 γ Acetylcholin, *2* 200 γ WV 560, ohne Spülen zugesetzt; ↓ Spülen

einen deutlich positiv ino- und chronotropen Effekt aus, der nach wiederholter Auslösung verschwand, sich aber nach erneuter Einwirkung von Adrenalin wieder hervorrufen ließ (Abb. 4b).

Die positiv inotrope Wirkung des WV 560 am Froschherzen spricht für einen mit der Freisetzung von Sympathin verbundenen Mechanismus. Die Versuche, in denen Vorbehandlung mit Adrenalin notwendig war, um überhaupt eine positiv inotrope Wirkung zu erhalten, machen es wahrscheinlich, daß die Auslösung dieser Wirkung das Vorhandensein ausreichender Mengen adrenergischer Wirkstoffe im Herzen voraussetzt. Die stimulierende Wirkung des WV 560 ist so stark, daß sie ein durch Acetylcholin zum Stillstand gebrachtes Herz wieder zum Schlagen bringt (Abb. 4c) und den sonst durch Acetylcholin verursachten Herzstillstand verhindert. Nicotin besitzt dagegen keine Wirkung am isolierten Froschherzen.

5. Versuche am Kaninchenohr — Gefäßpräparat. Nicotin verursacht am isoliert durchströmten Kaninchenohr eine Gefäßverengerung, die durch Ganglienblocker aufgehoben wird (Kottegoda). Die Constriction beruht auf der Freisetzung einer adrenalinartigen Substanz, welche aus nervösen Elementen der Haut stammen muß, da Enthäutung den gefäßverengenden Nicotineffekt beseitigt.

20—40 γ WV 560 riefen bei 12 von 17 durchströmten Ohren eine schwache Abnahme der Tropfenzahl hervor, die sich durch Ganglienblocker, aber auch durch höhere Dosen von WV 560 selbst (100 γ und mehr) verhindern ließ.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen

Das wichtigste Ergebnis der Versuche ist die grundlegende Änderung des pharmakologischen Charakters der Substanz — Benzyltrimethylammoniumbromid —, von der wir ausgingen, durch Halogen-Substitution am Ring. Die Einführung von Brom in meta-Stellung läßt den muscarinartigen Charakter der Ausgangssubstanz nicht nur bestehen, sondern verstärkt ihn sogar. Die Brom-Substitution in para-Stellung läßt die nicotinartige Wirkung ganz in den Vordergrund treten: WV 560 wirkt schon am nicht atropinisierten Tier rein pressorisch, durch die Ausschüttung von Adrenalin aus den Nebennieren darmlähmend und hyperglykämisch. Ganglienblocker verhindern diese Wirkungen. WV 560 ist somit wirkungsmäßig dem Tetramethylammonium verwandt, dem Grundkörper aller Verbindungen der Cholin-, Acetylcholin- und auch der Benzyltrimethylammonium-Reihe.

Die nicotinartige ganglionäre Erregungswirkung des WV 560 ist aber nicht nur an die Substitution in para-Stellung, sondern auch an die Substitution mit Halogen (Brom) geknüpft. Die entsprechenden p-Methoxy-, p-Nitro- und p-Oxy-Verbindungen besitzen diese Wirkung nicht (Credner, Kawan u. Krüger).

Zusammenfassung

1. Benzyltrimethylammoniumbromid verliert durch Bromsubstitution in para-Stellung fast vollständig den „muscarinartigen" Wirkungscharakter; dafür tritt eine starke „nicotinartige" Wirksamkeit auf (WV 560). Bromsubstitution in meta-Stellung verstärkt lediglich die muscarinartige Wirksamkeit des Grundkörpers.

2. Die Wirkungen des WV 560 auf Blutdruck und Blutzucker, Darm und Nickhaut lassen sich durch Ganglienblocker beseitigen, Nebennierenentfernung schwächt sie ab.

3. Am isolierten Darm ist die erregende Wirkung nur zum Teil atropinempfindlich; der verbleibende Rest läßt sich durch Ganglienblocker beseitigen.

4. Am Froschherzen besitzt WV 560 sowohl positiv als auch negativ inotrope und chronotrope Wirkungen. Manche Herzen reagieren zunächst überhaupt nicht. Ein Teil dieser Herzen spricht aber nach vorheriger Gabe einer kleinen Adrenalindosis auf WV 560 mit einer deutlichen Erhöhung der Amplitude und Frequenz an.

5. Am Kaninchenohr verursachen 20—30 γ WV 560 eine Gefäßverengung. Höhere Dosen verhüten diese ebenso wie die gefäßverengende Nicotinwirkung.

Literatur

Burn, J. H.: Brit. med. J. **4725**, 199 (1951).
Credner, K., H. Kawan u. K. Krüger: Arzneimittel-Forsch. **6**, 31 (1956).
Credner, K., K. Krüger u. K. Neugebauer: Klin. Wschr. **1953**, 706.
Kottegoda, S. R.: Brit. J. Pharmacol. **8**, 83, 353 (1953).
Kroneberg, G.: Klin. Wschr. **1950**, 353.
Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **206**, 164 (1949).
Stephenson, R. P.: J. Physiol. **167**, 162 (1948).

Dr. K. Credner, Wissenschaftliche Laboratorien der Diwag
Chemische Fabriken AG., Berlin-Waidmannslust, Oraniendamm 7—9

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 311—329 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel

Über die Wirkung von Morphin und einigen zentral-erregenden Stoffen auf den Miktionsreflex

Von

Friedrich-Karl Ohnesorge

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. April 1958)

Die höheren Anteile des Zentralnervensystems sind am Entleerungsreflex der Harnblase wesentlich beteiligt, obgleich auch die Existenz spinaler Reflexzentren erwiesen zu sein scheint (Lit. bei Adler 1929, Gruber 1933, Langworthy et al. 1940). Über die Bedeutung der höheren Ebenen des ZNS für die Steuerung des Miktionsreflexes existieren jedoch nur wenige experimentelle Arbeiten. Barrington (1915, 1921/1922) hat gezeigt, daß der Miktionsreflex nach Decerebrierung bestehen bleibt, sich aber nach Durchtrennung des Hirnstammes in Höhe der Mitte der Brücke oder tiefer nicht mehr auslösen läßt. Später gibt er eine genauere Lokalisation dieses Zentrums an (Barrington 1925). Langworthy u. Kolb (1933) finden bei Durchschneidungsversuchen in verschiedenen Ebenen des Gehirns, daß die zur Auslösung des Miktionsreflexes erforderliche Füllung der Harnblase um so geringer wird, je tiefer der Querschnitt erfolgt. Beiderseitige Abtragung der motorischen Rinde vermindert das zur Auslösung der Miktion notwendige Füllungsvolumen. Durchtrennung eben unterhalb der Colliculi optici führt zu weiterer Verminderung der Füllungsmenge. Nach Durchschneidung unterhalb der Colliculi acustici tritt der Reflex auch bei großen Füllungsvolumina nicht mehr auf. Zu ähnlichen Folgerungen kommen auch Levin u. Langworthy (1937) auf Grund chronischer Versuche an Katzen nach Durchschneidung des Tegmentum.

Aus diesen Untersuchungen läßt sich schließen, daß das Gehirn auf die pontinen und sakralen Reflexzentren nur hemmende Impulse ausübt (Denny-Brown u. Robertson 1933 A). Doch sprechen die Ergebnisse zahlreicher Autoren, die nach elektrischer Reizung vieler Punkte des Groß- und Stammhirnes fast ausschließlich Blasenkontraktionen beobachtet haben, gegen eine solche Anschauung (Lit. bei Langworthy 1940). Kürzlich haben nun Tang (1955) sowie Tang u. Ruch (1956) durch verschieden hohe Decerebrierung die Existenz von mindestens vier, teils den Miktionsreflex hemmenden, teils fördernden Ebenen nachweisen können. Sie unterscheiden: 1. Ein cerebrales, hemmendes Areal,

2. ein hypothalamisches, förderndes Areal, 3. ein mesencephales, hemmendes Areal und 4. ein pontines, förderndes Areal.

Angesichts solcher Beeinflussung des Miktionsreflexes durch höhere Anteile des ZNS und angesichts der allgemein bekannten Abhängigkeit des Miktionsbedürfnisses von psychischen Faktoren erscheint es seltsam, daß die Literatur über die Wirkung zentral-nervös angreifender Pharmaka auf den Miktionsreflex überaus spärlich ist.

Barrington (1931 A) findet in tiefer Chloroform- oder Äthernarkose ein Verschwinden dieses Reflexes. Kolb u. Langworthy (1938) beschreiben eine deutliche Beeinträchtigung des Miktionsreflexes unter „leichter Äthernarkose". Nach intraperitonealen mittleren Gaben von 30 mg/kg Nembutal und Dial sowie in tieferer Äthernarkose beobachten sie ein Verschwinden des Entleerungsreflexes. Aus anderen Arbeiten [von Brücke u. Knebel (1942), Langworthy u. Hesser (1936), Langworthy u. Kolb (1933), Levin u. Langworthy (1937), Mellanby u. Pratt (1940)] geht hervor, daß der Miktionsreflex in leichteren Narkosestadien noch gut auslösbar ist.

Pellacani (1882) und Hanč (1898) beschreiben eine Steigerung der Reflexerregbarkeit der Harnblase nach Strychnin. Andererseits benutzt Hift (1929) Strychnin zur Abschwächung krankhaft gesteigerten Harndranges. Cardiazol macht nach längerer Latenzperiode eine Kontraktion der Harnblase (Camp 1928). Amphetamin hingegen verursacht eine Erweiterung der Harnblase (Loman et al. 1938) und wird zur Erweiterung der spastisch kontrahierten Blase verwendet (Carrol et al. 1940; Myerson u. Ritvo 1936) während es andererseits Spasmen des Blasen- und Rectumsphincters hervorruft (O'Connor 1937).

Lediglich die Wirkung des Morphins auf die Harnblase ist lange bekannt und häufig bearbeitet worden. Sie wird von vielen Autoren als zentral bedingter „Sphincterkrampf" gedeutet (Hanč 1898, Tappeiner 1899, Czapek u. Wassermann 1914, v. Leersum 1918, Ikoma 1924, Hirano 1933 A, Hitati 1938). Edmunds u. Roth (1920) und Winter (1941) finden nach Morphin den Innendruck der Blase erhöht, während Uchigaki (1927), Hirano (1933 B, 1938) und Hitati (1938) nach kleinen Morphingaben ein Ansteigen, nach großen Gaben ein Sinken des Innendruckes beschreiben. An der durch 9% NaCl-Lösung spastisch gemachten Blase haben Morphin und Codein eine deutliche spasmolytische Wirkung (Christ 1938). Über eine Beeinflussung des Miktions*reflexes* sind kaum Angaben vorhanden. Die nach Ischiadicusreizung auftretenden reflektorischen Detrusorkontraktionen werden durch Morphin abgeschwächt (Hanč 1898). Van Duzen et al. (1940) finden dagegen nach Morphin eine erhöhte Reizbarkeit der Blase gegen Erhöhung des Innendrucks und eine Verminderung ihrer Kapazität.

Diese spärlichen und sich zudem häufig widersprechenden Angaben veranlaßten uns, den Einfluß verschiedener zentral wirksamer Pharmaka auf den Miktionsreflex an nichtnarkotisierten Tieren zu untersuchen. Dabei sollte geprüft werden, ob Decerebrierung in verschiedenen Höhen die Wirkung dieser Stoffe verändert.

Methodik

Die Versuche am nichtnarkotisierten Ganztier wurden an männlichen Kaninchen und an Katzen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Tiere in Rückenlage. Die Kaninchen wurden in Lokalanaesthesie intubiert; Katzen in vorübergehender Äther-

narkose tracheotomiert und künstlich beatmet. Die Tiere wurden durch Dauerinfusion von Succinylcholin (0,4 mg/min/Tier), in wenigen Versuchen durch d-Tubocurarin (0,01—0,03 mg/min/Tier) immobilisiert.

Decerebrierungen wurden nur an Katzen in tiefer Äthernarkose nach vorheriger doppelseitiger Unterbindung der A. carotis und doppelseitiger Durchtrennung des cervikalen Vagus-Sympathicus vorgenommen. Der abgetrennte orale Teil des Gehirns wurde durch Saugung (Wasserstrahlpumpe) entfernt, der verbliebene Teil nach Versuchsende entnommen und zur Bestimmung der Schnittebene in Formol fixiert. Zur Blutstillung der Schnittflächen benutzten wir dünne Blättchen aus getrocknetem Makrodex, die auf blutende Gefäße der Hirnschnittfläche oder der Schädelbasis aufgelegt, sofort blutstillend wirken. Spontanatmung war bei allen Tieren zumindest vorübergehend vorhanden, häufig wurde sie durch künstliche Hyperventilation (40/min) unterdrückt. In einem Teil der Versuche wurden die Krämpfe nach Verabreichung zentralerregender Stoffe durch Dauerinfusion von Succinylcholin verhindert. Versuchsbeginn 2 Std nach Ende der Decerebrierung.

Der intravesicale Druck wurde über einen in die Harnröhre eingeführten Katheter durch kombinierte Wasser-Luft-Transmission auf eine Marey'sche Kapsel (⌀ 24 mm) registriert. Der Druck wurde ab Symphysenhöhe gemessen. Volumenverschiebung pro 10 cm H_2O Druckänderung 0,3 ml. Die Auffüllung der Harnblase erfolgte über ein Urethra-nahes T-Stück durch den Katheter mit 0,9% NaCl-Lösung (Shoji 1920) mittels einer Infusionsmaschine (v. Brücke u. Knebel 1942). Beim Einsetzen des Miktionsreflexes wurde die Auffüllung im allgemeinen beendet. Die Füllflüssigkeit wurde auf 37° C vorgewärmt. Die Einlaufgeschwindigkeit betrug 3,5—3,8 ml/min. Vorversuche an Kaninchen zeigten, daß der Füllungsgrad der Blase beim Einsetzen des Miktionsreflexes weitgehend unabhängig von der Einlaufgeschwindigkeit ist (0,4—4,0 ml/min). Äußere Katheterdurchmesser: Männliche Kaninchen 4 mm, männliche Katzen 1,5 mm, weibliche Katzen 3 mm; Material: P. V. C. Da sich Druckänderungen im Bauchraum (Atmung, Bauchpresse) auf den intravesicalen Druck übertragen, wurde in einem großen Teil der Versuche der intraabdominale Druck mitregistriert. In ein intraperitoneales Luftdepot von 100 ml wurde eine Kanüle (⌀ 2 mm) eingeführt, die mit einer Marey'schen Kapsel (⌀ 24 mm) verbunden war. Rektaltemperatur 37,5° C ± 0,5° C. Zeitschreibung: 1 min. Eichungen in Zentimeter Wassersäule.

Ergebnisse

1. Das Verhalten des Miktionsreflexes am wachen Ganztier und am decerebrierten Tier, seine Beeinflussung durch d-Tubocurarin und Succinylcholin

In Übereinstimmung mit Tang u. Ruch (1955) konnten wir keine wesentlichen Änderungen des Tonus[1] der Harnblase durch Decerebrierung in verschiedenen Ebenen und durch Muskelrelaxantien feststellen, bevor die Füllung der Harnblase das zur Miktionsauslösung erforderliche Volumen erreicht hatte. Da die Beziehungen zwischen Blasendehnung und -innendruck mehrfach beschrieben worden sind (ältere Lit. bei Langworthy et al. 1940; v. Brücke u. Knebel 1942, Carpenter u. Root 1951, Tang u. Ruch 1955) erübrigt sich eine weitere Darstellung.

[1] Unter Tonus verstehen wir lediglich die Beziehung zwischen Blasendehnung und Blaseninnendruck, die also durchaus unabhängig von einer zentralen Steuerung bestehen können.

Einführend soll das Verhalten des Miktionsreflexes am wachen Ganztier und an decerebrierten Präparaten und seine Beeinflussung durch Muskelrelaxantien beschrieben werden, da in den uns bekannten Arbeiten anderer Autoren (Lit. bei Langworthy et al. 1940, Tang 1955) die Registrierung des Blasendrucks nach Einsetzen des Miktionsreflexes abgebrochen wurde. Lediglich Mellanby u. Pratt (1940 B) setzten die Registrierung nach Beginn einer starken isometrischen Kontraktion (bis 100 mm Hg) fort, und beobachteten bei gleicher Blasenfüllung dann ein wiederholtes Auftreten dieser Kontraktion bei Katzen.

Es gelang uns nicht, von wachen ungelähmten Katzen brauchbare Blasen- und Bauchdruckkurven herzustellen. Wir benutzten deshalb zu diesem Zweck *Kaninchen*. Die bis zum Einsetzen des Miktionsreflexes benötigten Füllungsmengen betragen im Mittel aus Versuche an 5 Tieren 59,6 ml (kleinste Füllungsmenge 24,5 ml, größte 115,0 ml). Bei wiederholten Auffüllungen an einem Tier nehmen die Füllungsmengen während der ersten 5—8 Registrierungen häufig um 10—30 ml zu, um dann einigermaßen konstant zu bleiben. Der Innendruck der Harnblase bei Beginn des Miktionsreflexes liegt im Mittel bei 12,3 cm H_2O (minimal 9,1 cm H_2O, maximal 15,2 cm H_2O). Der Miktionsreflex selbst ist gekennzeichnet durch eine ziemlich abrupte Steigerung des Blaseninnendruckes auf 35—60 cm H_2O, die nach Erreichen des Druckmaximums sogleich wieder abfällt und nach 20—40 sec beendet ist. Hierbei wird nahezu der gesamte Blaseninhalt durch die Urethra neben dem Katheter herausgepreßt. Es gelang nicht, diese Spontanentleerung der Blase zu verhindern, da sich dickere als die verwendeten Katheter nicht mehr in die Harnröhre einführen ließen.

Der Miktionsreflex ist mit einer kräftigen Kontraktion der Bauchdecken gekoppelt, die den Druck im Intraperitonealraum auf 30—60 cm H_2O steigen läßt.

Dauerinfusion von d-Tubocurarin nach einer i.v. Anfangsdosis von 0,3 mg/kg führen zu einem Absinken des intraperitonealen Druckes auf 1,7—2,0 cm H_2O (normal 3,1—4,5 cm H_2O) und zu völliger Lähmung der quergestreiften Muskulatur. Bis zum Beginn des Miktionsreflexes fließen im Mittel 40,4 ml (kleinste Füllungsmenge 24,4 ml, größte 61,3 ml) in die Blase ein (Werte aus Versuchen an 5 Tieren). Der Blaseninnendruck bei Beginn des Miktionsreflexes beträgt im Mittel 6,4 cm H_2O (minimal 3,6 cm H_2O, maximal 8,6 cm H_2O). Auf der Höhe des Miktionsreflexes werden Drucke von 9—17 cm H_2O erreicht, häufig jedoch erst nach längerem „Üben" durch wiederholte Auffüllung. Auch bei den gelähmten männlichen Kaninchen wird während des Miktionsreflexes der größte Teil des Blaseninhaltes neben dem Katheter herausgepreßt.

Bei männlichen und weiblichen *Katzen* hingegen gelingt es relativ leicht, Katheter entsprechender Dicke (siehe Methodik) durch die

Harnröhre in die Blase einzuführen, so daß während des Miktionsreflexes keine Füllflüssigkeit neben dem Katheter herausgedrückt werden kann.

Wie schon Tang (1955) sowie Tang u. Ruch (1955/1956), so finden auch wir bei verschieden hoch decerebrierten Katzen keine deutlichen Änderungen des Tonus während der Auffüllung der Harnblase, deutliche Unterschiede aber in den Füllungsmengen, bei denen der Miktionsreflex auftritt. Bei wiederholten Auffüllungen an einem Tier verändern sich diese Mengen häufig um ± 10—20 ml. In Versuchen an 15 wachen, nicht gelähmten, decerebrierten Katzen tritt der Miktionsreflex abhängig von der Höhe der Decerebrierung nach Füllung mit 6 bis 70 ml Flüssigkeit auf. Der Blaseninnendruck bei Beginn des Miktionsreflexes liegt im Mittel bei 16,4 cm H_2O (minimal 10,0 cm H_2O, maximal 24,0 cm H_2O) und steigt innerhalb weniger Sekunden auf Maxima von 44—100 cm H_2O. Diese Blasenkontraktion ist im allgemeinen nach 1—2 min beendet. Sie wiederholt sich bei gleichbleibender Füllung in Abständen von 2—10 min in etwa $^2/_3$ der Versuche, beim Einzeltier häufig mit erstaunlich gleichbleibender Frequenz mindestens 45 min lang. Nicht selten erschlafft aber die Harnblase nach Erreichen des Maximaldruckes nicht oder nur unvollkommen; sie zeigt dann regelmäßig kleine Kontraktionswellen mit einer Frequenz von 3—6 min. Kurz nach Beginn der reflektorischen Blasenkontraktion steigt der Druck im Abdomen von Ruhedrucken zwischen 2,0 und 4,5 cm H_2O auf Werte von 5,0 bis 13,0 cm H_2O an. Beim Erschlaffen der Blase fällt er wieder auf den Ruhewert zurück, um bei erneutem Einsetzen des Miktionsreflexes wieder anzusteigen. Erschlafft die Blase nicht, so bleibt auch der Bauchinnendruck erhöht (Abb. 1). Eine Abhängigkeit des eben geschilderten Verhaltens des Miktionsreflexes und der damit gekoppelten Veränderungen des Bauchdruckes von der Decerebrierungshöhe ließ sich nicht feststellen.

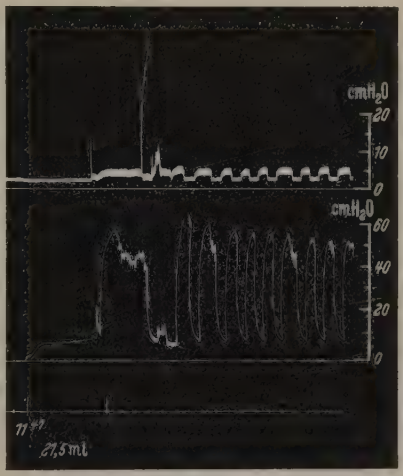


Abb. 1. Weibliche decerebrierte Katze, 2,6 kg. Oben: Intraabdominaldruck. Mitte: Blaseninnendruck. Unten: Hohe Signale = Beginn und Ende der Blasenauffüllung. Kleine Signale = Zeit (1 min). Beschreibung siehe Text

In den Versuchen, wo nach Einsetzen des ersten Miktionsreflexes keine rhythmischen Wiederholungen desselben erfolgen, gelingt es regelmäßig, eine adäquate Blasen- und Bauchdeckenkontraktion durch

ganz leichtes Hin- und Herschieben des Katheters in der Harnröhre auszulösen. Dieser Reflex tritt bei leerer oder nur teilweise gefüllter Blase nicht auf. Er ist auch nicht auszulösen bei Tieren, die im caudalen Teil des oberen Drittels der Pons decerebriert sind, und bei denen auch bei maximaler Füllung der Blase kein spontaner Miktionsreflex mehr auftritt (siehe Barrington 1921).

D-Tubocurarin, das bei Kaninchen allenfalls eine geringe Depression des Miktionsreflexes verursacht, ist zur Ruhigstellung der quergestreiften Muskulatur bei Katzen für unsere Zwecke nicht brauchbar. Es führt in einer Dosierung von 0,2—0,3 mg/kg i.v. zu einer erheblichen Abschwächung des Miktionsreflexes, der erst im Laufe von 20—25 min allmählich wieder zur Norm zurückkehrt. Die Folgefrequenz des Reflexes wird dabei nicht gestört. Succinylcholin hingegen beeinflußt in muskellähmender Dosierung den sich regelmäßig wiederholenden Miktionsreflex nicht. Während i.v. Injektionen von 0,5 mg/kg Succinylcholin mit anschließender Dauerinfusion für eine motorische Dauerlähmung der Katzen völlig ausreichen, führen erst i.v. Gaben ab 5 mg/kg zu einer plötzlichen und vollständigen Aufhebung des Miktionsreflexes, die etwa 10—15 min lang anhält. Nach dieser Zeit tritt der Reflex in unveränderter Stärke und Frequenz wieder auf. Allerdings hat Succinylcholin regelmäßig auch schon in Dosen von 0,5 mg/kg eine deutliche Wirkung auf den Miktionsreflex in den Versuchen, wo die Erschlaffungsphase der reflektorischen Blasenkontraktion gestört ist. Es bewirkt hier, ähnlich wie d-Tubocurarin, den sofortigen Abfall des erhöhten Blaseninnendrucks. Anschließend tritt jedoch der Miktionsreflex in unverminderter Stärke und regelmäßiger Folge auf. Über Veränderungen der Blasenkapazität bis zum Einsetzen des Miktionsreflexes und Änderungen des Blaseninnendrucks zu diesem Zeitpunkt durch d-Tubocurarin und Succinylcholin können keine sicheren Aussagen gemacht werden. Der Ruhedruck im Bauchraum vermindert sich unter der Wirkung der beiden Muskelrelaxantien um 0,5—2,0 cm H_2O.

Das Verhalten des Miktionsreflexes ist bei wachen, mit Succinylcholin gelähmten (Ganz)-Katzen von dem der decerebrierten gelähmten Tiere praktisch nicht zu unterscheiden. Bei Versuchen an 7 Tieren beträgt die Menge der bis zum Miktionsbeginn eingelaufenen Füllflüssigkeit zwischen 25,0 und 86,0 ml. Der Innendruck der Blase zu diesem Zeitpunkt liegt im Mittel bei 10,1 cm H_2O und schwankt zwischen 6—18 cm H_2O. Während der Miktion erreichen die Maximaldrucke Werte zwischen 40—80 cm H_2O. Ebenso wie bei den decerebrierten Katzen ist die Folgefrequenz der Reflexe beim Einzeltier im allgemeinen recht konstant, während bei wiederholten Auffüllungen die zur Miktionsauslösung nötigen Flüssigkeitsmengen häufig um 10—20 ml schwanken.

2. Wirkung zentral angreifender Pharmaka auf den Miktionsreflex

Morphin. Während, wie bereits einleitend erwähnt, und durch eigene Untersuchung an Kaninchen (zusammen mit Ch. Niemeyer), bestätigt wurde, flachere Narkosestadien (Äther, Urethan, Magnesium) keinen wesentlichen Einfluß auf die Funktion der Harnentleerung haben, zeigte sich Morphin in schon kleinen Dosen überraschend stark wirksam. Bei wachen, nicht gelähmten Kaninchen und bei Succinylgelähmten Katzen bewirken 1,0—2,0 mg/kg Morphin-HCl eine erhebliche Abschwächung

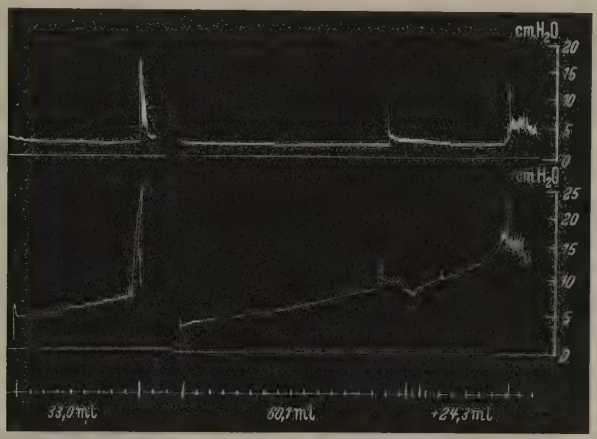


Abb. 2. Männliches Kaninchen 2,7 kg. Oben: Intraabdominaldruck. Mitte: Blaseninnendruck. Unten: Signale siehe Abb. 1. 3 min vor Beginn der 2. Auffüllung: 2 mg/kg Morphin-HCl. Artefact in der Mitte der 2. Kurve. Weitere Beschreibung siehe Text

oder vollständige Aufhebung des Miktionsreflexes. Abb. 2 zeigt als Beispiel einen Versuch am Kaninchen. Bei vier der Morphininjektion vorausgehenden Auffüllungen sind bis zum Beginn des Miktionsreflexes 32,4—33,0 ml in die Blase eingelaufen; der Blaseninnendruck in diesem Moment liegt zwischen 6,2 und 6,9 cm H_2O. Während der mit einer kräftigen Bauchdeckenkontraktion einhergehenden Miktion wird regelmäßig der größte Teil der Füllflüssigkeit neben dem Katheter herausgepreßt. Bei der nächsten, 3 min nach i.v. Injektion von 2,0 mg/kg Morphin beginnenden Auffüllung wird der Reflex erst durch eine Blasenfüllung von insgesamt 84,6 ml (27 min post Inj.) bei einem Innendruck von 16,5 cm H_2O ausgelöst. Dabei fließen nur wenige Tropfen Füllflüssigkeit neben dem Katheter heraus. Eine Beeinflussung des Tonus der Harnblase haben wir nicht feststellen können.

Die Versuche an Katzen ergeben bei gleicher Morphindosierung ein ähnliches Bild: Der bei gleichbleibender Füllung rhythmisch auftretende Miktionsreflex wird zusammen mit der sonst gleichzeitig auftretenden Bauchdruckerhöhung ausgelöscht; durch vermehrte Füllung lassen sich

beide Reflexe manchmal noch auslösen. Morphin in geringerer Dosierung (0,2—0,5 mg/kg) verursacht nur in einigen Fällen eine geringe Abschwächung der Amplitude und der Dauer der reflektorischen Blasenkontraktionen, bleibt in anderen Versuchen aber ohne erkennbare Wirkung.

Decerebrierung in verschiedenen Höhen (bis zur Ebene: Hintere Vierhügel — rostrales Ende der Pons) führt zu keiner Änderung der Morphinwirkung. Auch der durch leichtes Verschieben des Katheters in der Harnröhre auslösbare Blasenreflex wird durch 1,0—2,0 mg/kg Mor-

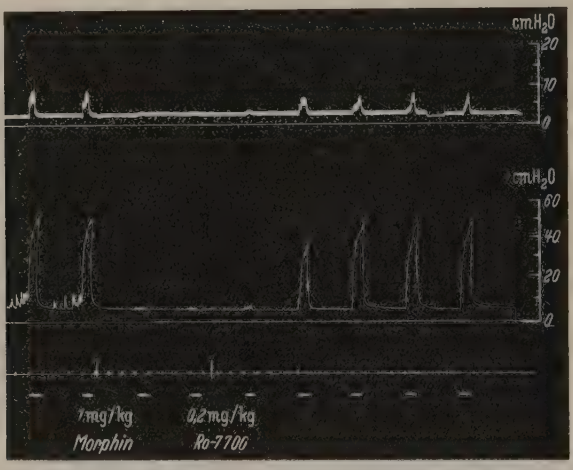


Abb. 3. Weibliche decerebrierte Katze 2,7 kg. Oben: Intraabdominaldruck. Mitte: Blaseninnendruck Unten: Signal und Zeit. Auslösung des Miktionsreflexes durch leichtes Hin- und Herschieben des Katheters in der Harnröhre (—). Bei der nächsten, 10 min später beginnenden Auffüllung läßt sich der Reflex auch bei stärkster Füllung nicht mehr auslösen

phin zusammen mit der zugehörigen Bauchdeckenkontraktion völlig unterdrückt, während 0,2—0,5 mg/kg ohne jede Wirkung bleiben. Durch (—)-3-Oxy-N-allylmorphinan (Ro 7700) (0,2 mg/kg i. v.) gelingt es, die Lähmung des Reflexes vorübergehend für etwa 30—45 min zu durchbrechen (Abb. 3). In keinem unserer Versuche haben wir nach Morphin eine wenn auch nur vorübergehende Steigerung des Blaseninnendrucks beobachten können. Die Lähmung des Miktionsreflexes tritt ohne jede vorhergehende Erregungsphase ein und hält mindestens 120 min lang an. Eine Beeinflussung des Tonus läßt sich auch bei Katzen nicht feststellen.

Da wir zunächst einmal einen Überblick über die Wirkung zentralnervös angreifender Pharmaka auf den Blasenreflex bekommen wollten, stellten wir die Untersuchung Morphin-ähnlich wirkender Verbindungen zunächst zurück und wandten uns der Prüfung einiger zentral erregender Stoffe zu.

Strychnin. Wachen, mit d-Tubocurarin gelähmten Kaninchen wurde Strychninnitrat in einer Dosierung von 0,02—1,0 mg/kg verabfolgt. 1—2 min vor Beginn einer Auffüllung i. v. injiziert, bleiben 0,02 bis 0,05 mg/kg ohne jede Wirkung auf Tonus, Kapazität und Miktionsreflex. Höhere Dosen (0,1—1,0 mg/kg) beeinflussen den Tonus der Blase ebenfalls nicht, doch tritt regelmäßig schon bei einer Füllung von 7 bis 10 ml 3—4 min post Inj. eine kräftige, dem Miktionsreflex sehr ähnliche Blasenkontraktion auf, ohne daß jedoch Flüssigkeit neben dem Katheter

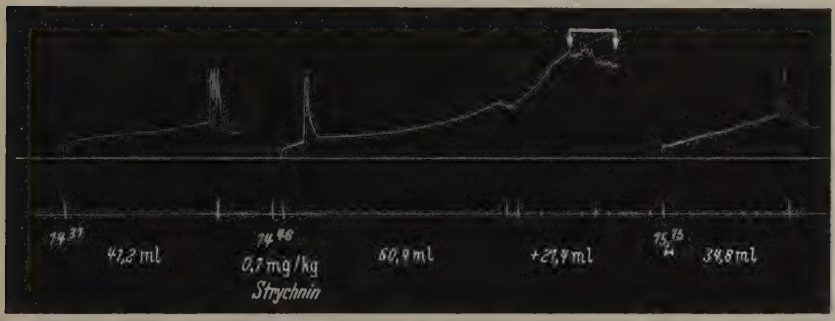


Abb. 4. Männliches Kaninchen 3,0 kg. Lähmung der quergestreiften Muskulatur mit d-Tubocurarin. Oben: Blaseninnendruck. Unten: Signal und Zeit. Bei ↓ ↓ tröpfelt bei weiterlaufender Auffüllung Urin neben dem Katheter aus der Harnröhre heraus. Weitere Beschreibung siehe Text

hinausfließt. Hiernach gelingt es nicht mehr, durch wachsende Auffüllung der Blase den Miktionsreflex auszulösen; der Blasendruck steigt schließlich progressiv an und bei Füllungsmengen zwischen 60—120 ml und Innendrucken zwischen 12—17 cm H_2O tropft die Füllflüssigkeit neben dem Katheder im Maße der Auffüllungsgeschwindigkeit ab. Diese reflexunterdrückende Wirkung hält nach 0,1 mg/kg etwa 15—25 min, nach 0,5 mg/kg länger als 50 min an (Abb. 4). Wird Strychnin während einer Auffüllung vor Einsetzen des Miktionsreflexes i. v. injiziert, so erfolgt 10—20 sec post Inj. die schon oben beschriebene kräftige Blasenkontraktion mit anschließender Lähmung des Miktionsreflexes. Kleinere Dosen (0,02—0,05 mg/kg) beeinflussen auch in diesen Versuchen weder den Blaseninnendruck während der Auffüllung noch den Miktionsreflex. An Succinylcholin-gelähmten wachen Katzen läßt sich der Entleerungsreflex häufig bereits mit kleinerer Dosierung (0,05 mg/kg Strychnin. nitr. i.v.) für 10—15 min unterdrücken, während noch kleinere Gaben völlig wirkungslos sind. Stets geht auch hier der Lähmung eine der Injektion unmittelbar folgende kräftige Blasenkontraktion voraus, die aber bei höheren Strychningaben (0,2—1,0 mg/kg) zunehmend abgeschwächt wird. Die Lähmung wird beendigt durch das plötzliche, spontane Wiedereinsetzen des Miktionsreflexes in unverminderter Stärke, wobei in einigen Versuchen der Blasendruck etwas verzögert ansteigt und die Dauer der

Kontraktion verlängert ist (Abb. 5). Durch vermehrte Füllung der Blase läßt sich der Reflex, in von der Dosierung abhängigen Zeitabständen von der Injektion, in gleichbleibender Stärke und Frequenz wieder auslösen.

Decerebrierung in verschiedenen Höhen verändert das Bild der Strychninwirkung an Succinylcholin-gelähmten Katzen nicht.

Die Wirkung von Strychnin auf die mit dem Entleerungsreflex gekoppelte Bauchdeckenkontraktion haben wir an nicht gelähmten decerebrierten Katzen untersucht. 0,05—0,1 mg/kg Strychnin. nitr. führen zu einer Steigerung des Bauchdruckes auf das 2—3 fache (10—20 cm H_2O) der Normalwerte während des Reflexes; durch sich überlagernde, wiederholte blitzartige Bauchdeckenkontraktionen schnellt der Druck im Bauchraum auf Werte von mehr als 60 cm H_2O. Auch die, durch die Strychnininjektion ausgelöste primäre Blasenkontraktionen wird von einer entsprechenden Erhöhung des Intraperitonealdruckes begleitet. Die Lähmung des Miktionsreflexes und der zugehörigen Bauchdeckenkontraktion erfolgt gleichzeitig nach vorangehenden, kräftigen, 2—3 min anhaltenden, klonisch-tonischen Krämpfen. Während der Lähmungsphase läßt sich auch durch Verschieben des Katheters in der Harnröhre weder eine Blasen- noch eine Bauchdeckenkontraktion auslösen.

Abb. 5. Weibliche Katze, 4,4 kg. Lähmung der quergestreiften Muskulatur durch Dauerinfusion von Succinylcholin. Oben: Blaseninnendruck. Unten: Signal und Zeit

Pikrotoxin, Cardiazol. Der überraschende Befund einer ausgeprägten Reflexhemmung nach Strychnin veranlaßte uns, die Effekte anderer Krampfgifte zu untersuchen, die nach allgemeiner Auffassung vorwiegend an höheren Ebenen des Zentralnervensystems angreifen. Es boten sich Pikrotoxin und Cardiazol wegen ihrer relativ gut durchuntersuchten Wirkungsweise an. Da beide Stoffe den Miktionsreflex ähnlich beeinflussen, auch zwischen intakten und verschieden hoch decerebrierten Tieren keine auffälligen Differenzen hinsichtlich der Dosierung oder der Wirkung bestehen, werden nachstehend die Effekte beider Pharmaka auf den Entleerungsreflex von decerebrierten und nicht decerebrierten Tieren gleichzeitig beschrieben.

Während 0,2 mg/kg Pikrotoxin i.v. nur in seltenen Fällen eine dämpfende Wirkung auf den Miktionsreflex haben, wird er durch 0,5 mg/kg

teils abgeschwächt, teils unterdrückt; 1 mg/kg führen immer zu einer vollständigen Lähmung der Reflexe. Diese Lähmung setzt erst nach einer Latenz von 3—6 min ein, ohne daß unmittelbar nach der Injektion

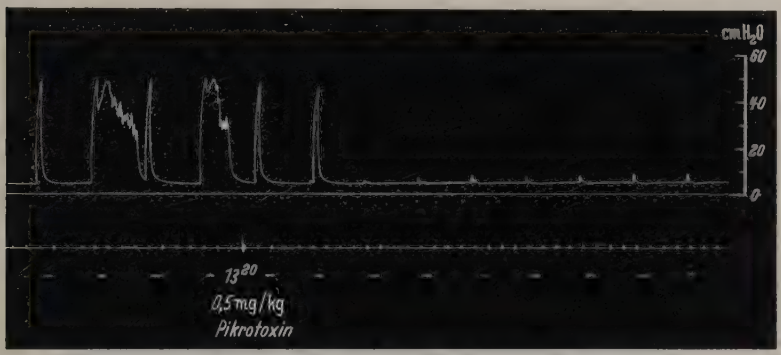


Abb. 6. Männliche decerebrierte Katze, 2,6 kg. Lähmung der quergestreiften Muskulatur mit Succinylcholin. Oben: Blaseninnendruck. Unten: Signal und Zeit. Auslösung des Miktionsreflexes durch leichtes Verschieben des Katheters in der Harnröhre

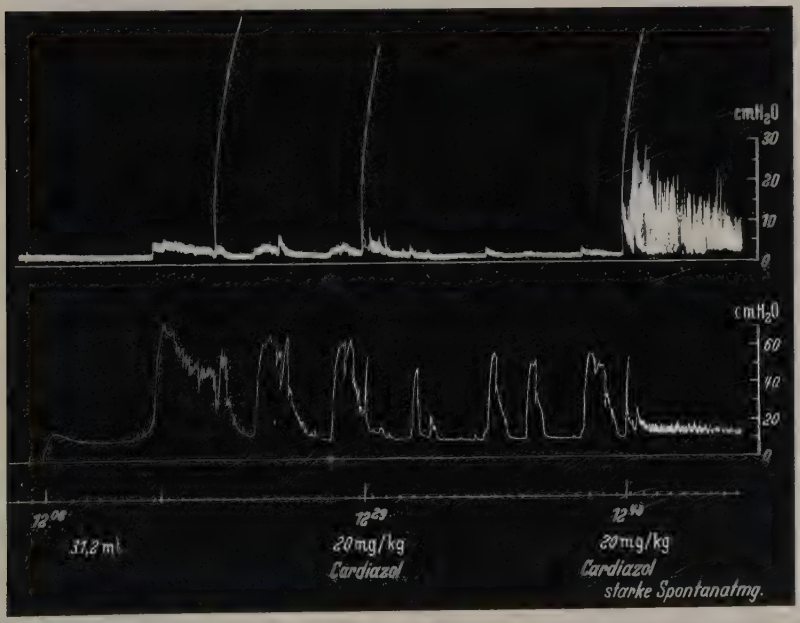


Abb. 7. Männliche decerebrierte Katze, 2,9 kg. Nicht gelähmt. Oben: Intraabdominaldruck. Mitte: Blaseninnendruck. Unten: Signal und Zeit. Nach der 1. Cardiazolinjektion Auftreten von Spontanatmung. Nach der 2. Injektion: Kurzer Krampf; dann sehr starke Spontanatmung

eine Erregungsphase folgt. Die Dauer der Pikrotoxinwirkung ist überaus unterschiedlich, sie schwankt nach 0,5 mg/kg zwischen 8 und 40 min und hält nach 1 mg/kg immer länger als 30 min an (Abb. 6). An

ungelähmten decerebrierten Katzen folgt auf die Injektion von 0,5 und 1,0 mg/kg Pikrotoxin ein Auftreten von forcierter Spontanatmung und von koordinierten, krampfartigen Bewegungen der Extremitäten.

Cardiazol führt in einer Dosierung von 20—50 mg/kg i.v. zu einer Abschwächung bzw. Unterdrückung der Entleerungskontraktionen der Blase, die 8—25 min anhält. In fast allen Versuchen erfolgt unmittelbar nach der Injektion eine kurzdauernde aber kräftige Druckerhöhung in

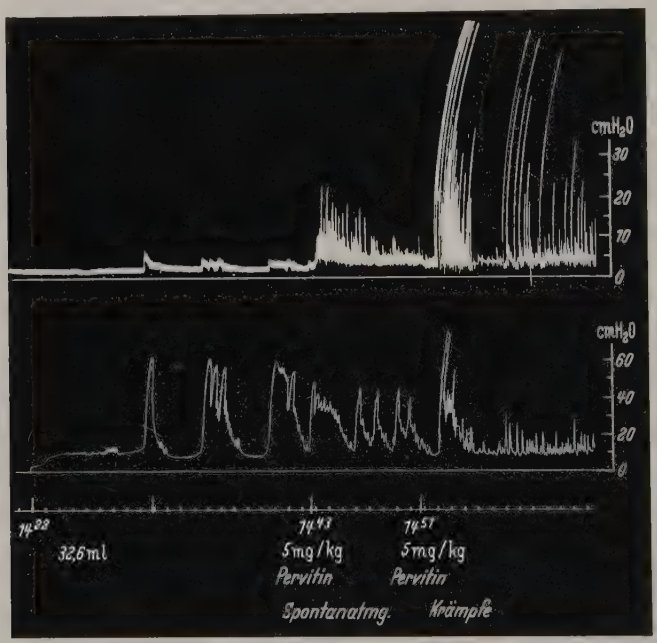


Abb. 8. Männliche decerebrierte Katze, 2,9 kg. Nicht gelähmt. Oben. Intraabdominaldruck. Mitte: Bauchinnendruck. Unten: Signal und Zeit. Nach der 1. Pervitininjektion: Starke Spontanatmung nach der 2. Injektion: Kurzer Krampf

der Blase, die nicht durch die bei ungelähmten Tieren gleichzeitig auftretende starke, kurze und krampfartige Bauchdeckenkontraktion bedingt ist, da sie auch bei gelähmten Tieren auftritt (Abb. 7). Auch kleine Cardiazolgaben (10 mg/kg) verursachen diese, einem Miktionsreflex durchaus ähnlich sehende Blasenkontraktion, zumal sie stets von einer mäßigen Steigerung des Bauchinnendrucks begleitet wird. Eine Dämpfung oder gar Lähmung des Miktionsreflexes haben wir in dieser Dosierung nicht beobachtet. An ungelähmten, decerebrierten Katzensetzen nach 20—50mg/kg Cardiazol leichte bis mittelstarke Krämpfe ein, die bis 5 min lang anhalten; die gleichen Dosen lösen eine kräftige, bis 30 min anhaltende Spontanatmung aus.

Der Druck in der gefüllten, ruhenden Harnblase (Tonus) wird weder durch Pikrotoxin noch durch Cardiazol deutlich verändert. Ebenso fehlt eine sichere Wirkung auf Amplitude und Frequenz der kleinen Blasenkontraktionen, die häufig zwischen den einzelnen reflektorischen Kontraktionen auftreten.

Pervitin. Es schien interessant, die Wirkung des Pervitins, als eines zentral-nervösen Stimulans mit anderem Wirkungstyp, auf den Miktionsreflex zu prüfen. Nach Pervitin in Dosen von 2—10 mg/kg i.v. tritt bei gelähmten Kaninchen und gelähmten oder ungelähmten decerebrierten Katzen eine Abschwächung oder völlige Hemmung des Entleerungsreflexes auf, die sich nicht von der der anderen zentralerregenden Stoffe unterscheidet (Abb. 8). Die Lähmung hält etwa 20 min oder länger an. Kleinere Dosen sind wirkungslos. Eine sichere, primäre Stimulierung des Reflexes (wie nach Strychnin oder Cardiazol) war nicht zu beobachten. Ein Einfluß auf den Tonus der Blase während der Auffüllung oder auf Amplitude oder Frequenz der kleinen Blasenkontraktion läßt sich nicht feststellen. Die Spontanatmung von decerebrierten Katzen wird durch Gaben von 2,0 mg/kg und mehr deutlich verstärkt bzw. ausgelöst und überdauert die Hemmung des Miktionsreflexes beträchtlich. Kurze vorübergehende Krämpfe treten an decerebrierten Katzen nach 5—10 mg/kg Pervitin auf.

Diskussion

Die Untersuchungen an Katzen und Kaninchen ergaben folgendes: 1. Der durch Auffüllung der Harnblase auslösbare Miktionsreflex wird durch d-Tubocurarin und Succinylcholin unterschiedlich beeinflußt. 2. Durch kleine Morphingaben sowie durch krampfmachende Dosen von Strychnin, Pikrotoxin, Cardiazol und Pervitin wird dieser Reflex unterdrückt. 3. Strychnin und Cardiazol bewirken zunächst eine kräftige Blasenkontraktion. 4. Decerebrierung in verschiedenen Höhen verändert die Wirkungen der genannten zentral wirksamen Pharmaka nicht. 5. Weder durch Decerebrierung noch durch einen der untersuchten Stoffe werden die Beziehungen zwischen Blasendehnung und -innendruck („Tonus") verändert.

Durch Versuche auch an ungelähmten Tieren haben wir gezeigt, daß die oben beschriebenen Effekte von Morphin und einigen zentralerregenden Stoffen durch d-Tubocurarin und Succinylcholin, die häufig zum Ruhigstellen der quergesteiften Muskulatur verabfolgt wurden, nicht beeinflußt werden[1].

Auf Grund der vorliegenden Literatur ist es unwahrscheinlich, daß die reflexunterdrückende Wirkung von Morphin, Strychnin, Pikrotoxin, Cardiazol und Pervitin auf einem peripheren Wirkungsmechanismus beruht, der theoretisch denkbar

[1] Die bei der Beschreibung des normalen Verhaltens besprochenen Eigenwirkungen der beiden Muskelrelaxantien auf den Miktionsreflex sollen in anderem Zusammenhang in einer späteren Arbeit erörtert werden.

wäre. Durch Morphin wird nach Ikoma (1924) und Ruickold (1933) das isolierte Detrusorstreifen-Präparat nicht beeinflußt; Edmunds u. Roth (1920) hingegen finden eine Tonuserhöhung. Ganglienblockierende Wirkungen des Morphins sind ebenfalls nicht bekannt geworden (Hebb u. Konzett 1949). Nahezu alle Autoren deuten die Effekte des Morphins auf die Blase als zentral bedingt. Während Ikoma (1924) eine Schwächung eines im Sakralmark gelegenen Detrusor-Zentrums vermutet, glaubt Hitati (1938) an eine Morphinbedingte Erregung im Gehirn liegender sympathischer Zentren. Auch Schaumann (1957) kommt zu dem Schluß, daß eine Störung des zur Harnentleerung führenden reflektorischen Mechanismus am wahrscheinlichsten ist, wie sie bereits Hanč (1898) vermutet hat.

Versuche mit den von uns angewandten Krampfgiften an isolierten Blasenstreifen sind uns nicht bekannt geworden. Die peripheren Wirkungen dieser Stoffe auf Ganglien und glatt-muskulärer Organe sind gering (Lit. bei Sollmann 1949, Goodman u. Gilman 1955, Hauschild 1956). Hanč (1898) beschreibt eine zeitweilige Abschwächung der durch Ischiadicusreizung an curarisierten Tieren ausgelösten Blasenkontraktionen nach *Strychnin*injektion, während Durchtrennung des Lumbalmarkes die durch große Strychnindosen hervorgerufene Zusammenziehung der Blase nicht verhindert. Aus diesen Versuchen kann auf einen Angriff des Strychnins am Sakralmark geschlossen werden. Die durch *Pikrotoxin* ausgelösten Blasenkontraktionen bleiben nach Durchtrennung der Nn. pelvici aus (Grünwald 1909). Da *Cardiazol* nach Rückenmarksdurchtrennung keine Blasenkontraktion mehr verursacht, schließt Camp (1928) auf einen zentralen Ursprung dieser Wirkung.

Für *Pervitin* haben wir keine entsprechenden Untersuchungen gefunden. Da viele Autoren über eine Erschlaffung des Detrusors nach Sympathicomimeticis berichten, scheint eine periphere Wirkung durchaus möglich. Doch halten wir, wegen des den anderen zentralerregenden Stoffen durchaus ähnlichen Wirkungsbildes, auch hier eher einen zentralen Wirkungsmechanismus für wahrscheinlich. Gestützt wird diese Ansicht auch durch die Beobachtung von Loman et al. (1938), die bei Menschen nach Amphetamin eine Blasenerschlaffung beobachteten, die der Blasenatonie nach Rückenmarksdurchtrennung durchaus ähnlich sah.

In Ergänzung der Arbeiten von Nesbit et al. (1947), Langley u. Whiteside (1951) und Tang u. Ruch (1955), die entgegen älteren Anschauungen gezeigt haben, daß der Blasentonus unabhängig von zentraler Beeinflussung auf den Eigenschaften des Blasenmuskels selbst beruht, konnten wir nachweisen, daß dieser „Tonus" weder durch Morphin noch durch zentralerregende Pharmaka verändert wird.

Die Frage schließlich, wo und auf welchem Wege die den Miktionsreflex unterdrückende Wirkung der genannten zentralwirksamen Gifte zustande kommt, ist an Hand der Literatur und der eigenen Untersuchung kaum befriedigend zu beantworten. Wenn es auch nahe liegt, die einander sehr ähnlichen Effekte dieser Stoffe auf einen ähnlichen zentralen Wirkungsmechanismus zu beziehen, so sollte man diesem Versuch doch mit Vorsicht begegnen. Unsere ursprüngliche Absicht, durch Decerebrierung in verschiedenen Höhen eine Differenzierung des Wirkungsbildes der verschiedenen Pharmaka herbeizuführen, hat sich als undurchführbar erwiesen. Die für die Lähmung des Miktionsreflexes verantwortlichen Strukturen müssen nach unseren Versuchen in tieferen Gebieten der Pons, der Medulla oblongata oder des Rückenmarkes

lokalisiert sein. Das gleichzeitige Verschwinden der normalerweise mit den reflektorischen Blasenkontraktionen gekoppelten Bauchdeckenreflexe deutet daraufhin, daß die Pharmaka nur den für beide Reflexe gemeinsamen Teil des Leitungssystems beeinflussen. Entsprechende Literatur, die eine genauere Lokalisation der betreffenden Bahnen ermöglichen könnte, haben wir jedoch nicht gefunden.

Grundsätzlich sind zur Erklärung der reflexhemmenden Wirkung folgende Möglichkeiten denkbar: 1. Direkte oder indirekte Erregung hemmende Neurone, 2. Blockierung der afferenten Bahnen im ZNS und 3. Eine zentral bewirkte Verstellung der Empfindlichkeit von Dehnungsreceptoren in der Blase.

Ad. 1. Zur Erklärung der allgemeinen reflexhemmenden Wirkung des *Morphins* wird heute von einigen Autoren (Irwin et al. 1951, Tagaki et al. 1955) eine Erregung supraspinaler hemmender Strukturen (vor allem der Subst. reticularis) angenommen (siehe auch Wikler 1950). Hitati (1938) erklärt die von ihm beobachtete Erniedrigung des Blaseninnendrucks nach Morphin mit einer Erregung im Gehirn liegender sympathischer Zentren, während v. Leersum (1918) als Ursache des Morphinbedingten Sphincterkrampfes eine Erregung eines parasympathischen Sphincterzentrums in der Medulla diskutiert. Die reflexerregenden und krampferzeugenden Eigenschaften des *Strychnins* werden heute vielfach als Lähmung hemmender Synapsen gedeutet (Bradley u. Eccles 1953), Purpura u. Grundfest 1957). Als Deutung käme nur die Vorstellung einer „Hemmung einer Hemmung" (Purpura u. Grundfest 1957) in Betracht, wenn man nicht doch eine Erregung hemmender Zentren in Erwägung ziehen will. Auch vom *Pikrotoxin* ist eine erregende Wirkung auf ein an der Grenze zwischen Brücke und Medulla gelegenes visceromotorisches Zentrum bekannt (Katsuki u. Ogata 1953), so daß auch eine Hemmung des Miktionsreflexes auf ähnlichem Wege denkbar wäre. *Cardiazol*, das nach Purpura u. Grundfest (1957) nur rein erregende Eigenschaften auf zentrale Synapsen hat, müßte zu einer direkten Erregung hemmender Strukturen führen. In diesem Sinne sind vielleicht auch die nach hohen Dosen auftretenden, postkonvulsiven Lähmungsstadien (Blume 1926) zu deuten. Dem *Pervitin* und *Amphetamin* kommen synapsenblockierende Eigenschaften im ZNS zu (Marazzi 1953); auch über zentralanalgetische Effekte, allein oder synergistisch mit Morphin wird berichtet (Kiessig u. Orzechowski 1941, Goetzl et al. 1943, Burril et al. 1943, Soehring u. Ergenzinger 1955), die, wenn nicht auf anderem Wege (siehe unten), auch über eine Erregung hemmender Substanzen zustande kommen könnten, was auch auf den Miktionsreflex zutreffen mag.

Ad. 2. Die Möglichkeit einer Blockierung afferenter Bahnen, entweder direkt, oder über eine Beeinflussung afferenter Synapsen im

Rückenmark durch absteigende Bahnen aus dem Gehirn (Hagbarth u. Kerr 1954), ist ebenfalls in Betracht zu ziehen. Fujita et al. (1953) berichten über eine Blockierung der zentralen afferenten Bahnen vom Splanchnicus, Vagus und Ischiadicus nach Morphin und über eine gleichartige Blockierung intracorticaler Neurone durch Morphin und Pervitin, was den Eindruck der in mancher Hinsicht ähnlichen Effekte dieser beiden Stoffe weiter verstärkt. Versuche, die auf eine ähnliche Wirkung von Strychnin, Cardiazol und Pikrotoxin schließen ließen, sind uns nicht bekannt.

Ad. 3. Langworthy et al. haben für die Regulierung des Blasentonus schon 1940 auf Grund theoretischer Überlegungen eine zentral bedingte Empfindlichkeitsänderung von Receptoren in der Blasenwand postuliert. Diese Vorstellung erscheint um so diskutabler, als inzwischen bewiesen worden ist, daß die Regulierung des Tonus der quergestreiften Muskeln durch einen derartigen Mechanismus erfolgt (γ-Efferenzen, Lit. siehe Fleischhauer 1957, Struppler 1957). Indessen gehen die Meinungen über den histologischen Aufbau der Blasenreceptoren und ihre funktionelle Bedeutung noch so weit auseinander (Michailow 1908, Stöhr 1926, Kleyntjens u. Langworthy 1937, Langworthy u. Murphy 1939), daß die obengenannte Vorstellung über die Modifikation der Receptorenempfindlichkeit nur als Hypothese erörtert werden kann. Experimentelle Untersuchungen über die Effekte zentral wirksamer Pharmaka kennen wir in diesem Zusammenhang ebensowenig, wie ausreichende Untersuchungen über die Natur der in Frage kommenden Receptoren.

Zusammenfassung

An Katzen und Kaninchen wurde die Wirkung von Morphin, Strychnin, Cardiazol, Pikrotoxin und Pervitin auf den Miktionsreflex untersucht. Der Miktionsreflex wird durch Morphin schon in kleinen Gaben, durch die zentralerregenden Pharmaka in krampferzeugender Dosierung, unterdrückt.

Decerebrierung in verschiedenen Höhen verändert diese Wirkung nicht.

Literatur

Adler, A.: Die Herausbeförderung des Harns. Hdb. d. norm. u. path. Physiol. IV, S. 804. Berlin 1929.

Barrington, F. J. F.: The nervous mechanism of micturition. Quart. J. exp. Physiol. **8**, 33 (1915). — The relation of the hindbrain to micturition. Brain **44**, 23 (1921). — The nervous control of micturition. Med. Sci. Abstr. and Rev. **5**, 216 (1921/1922). — The effect of lesions of the hindbrain and midbrain on micturition in the cat. Quart. J. exp. Physiol. **15**, 81 (1925). — Brain **54**, 23, (1931) [A]; zit. nach Kolb, C., and O. R. Langworthy: J. Pharmacol. exp. Ther. **63**, 108 (1938).

Bradley, K., and J. Eccles: Strychnine as a depressant of primary inhibition. Nature (Lond.) **171**, 1061 (1953).

v. Brücke, Fr., u. R. Knebel: Über die Dynamik der Harnblasenmuskulatur. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **199**, 465 (1942).

Burrill, D. Y., F. R. Goetzl and A. C. Ivy: Amphetamine. J. dent. Res. **23**, 513 (1943).

Camp, W. J. R.: The pharmacology of Cardiazol. J. Pharmacol. exp. Ther. **33**, 81 (1928).

Carpenter, F. G., and W. S. Root: Effect of parasympathetic denervation on feline bladder function. Amer. J. Physiol. **166**, 686 (1951).

Carrol et al.: The effect of drugs on the ureter. Mississippi med. J. **62**, 122 (1940); zit. nach Bonhoff, G., u. H. Levrenz: Über Weckamine. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer.

Christ, P.: Pharmakologische Versuche an der spastischen Blase der lebenden Kaninchen. Diss. Tübingen 1938; Ber. ges. Physiol. **113**, 661 (1939).

Czapek, A., u. G. Wassermann: Die akute Harnverhaltung, eine wenig beachtete Wirkung des Morphins. Dtsch. med. Wschr. **1914**, 1567; zit. nach Schaumann, O.: Hdb. d. exper. Pharmakol. Erg. Werk. 12. Bd. 1957.

Denney-Brown, D., and E. G. Robertson: On the physiology of micturition. Brain **56**, 149 (1933) [A].

Duzen, R. E. van, D. Slaughter and I. C. Winter: Effect of Trasentine and Morphine on urinary bladder of unanaesthetized dog. J. Urol. (Baltimore) **44**, 667 (1940).

Edmunds, Ch. W., and G. B. Roth: The point of attack of certain drugs acting on the periphery. I. Action on the bladder. J. Pharmacol. exp. Ther. **15**, 189 (1920).

Fleischhauer, K.: Muskelspindeln, Tonus und Reflexerregbarkeit. Dtsch. med. Wschr. **1957**, 783.

Fujita, S., M. Yasuhara and K. Ogiu: Studies on sites of action of analgesics. I. The effects of analgesics on afferent pathways of several nerves. Jap. J. Pharmacol. **3**, 27 (1953).

Fulton, J. F.: Physiologie des Nervensystems. Stuttgart: Ferdinand Enke 1952.

Goetzl, F. R., D. Burrill and A. C. Ivy: Dextroamphethamine. Fred. Proc. **2**, 16 (1943).

Goodman, L. S., and A. Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. 2nd Ed. The Macmillan Comp. New York 1955.

Gruber, Ch. M.: The autonomic innervation of the genito-urinary system. Physiol. Rev. **13**, 517 (1933).

Grünwald, H. F.: Zur Kenntnis des Pikrotoxins und seiner Beziehungen zum autonomen Nervensystem. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **60**, 249 (1909).

Hagbarth, K. E., and D. I. B. Kerr: Central influences on spinal afferent conduction. J. Neurophysiol. **17**, 295 (1954).

Hanč, A.: Experimentelle Studien über den Reflexmechanismus der Harnblase. Pflügers Arch. ges. Physiol. **73**, 453 (1898).

Hauschild, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. Leipzig: VEB Georg Thieme 1956.

Hebb, C. O., and H. Konzett: Difference between morphine and synthetic analgesics in their actions on ganglionic transmission. Nature (Lond.) **163**, 720 (1949).

Hift, R.: Dtsch. med. Wschr. **1929**, 31; zit. nach H. H. Meyer: Experimentelle Pharmakologie. Urban & Schwarzenberg 1936.

Hirano, Sh.: Über die Wirkung des Morphins auf die Harnblase des Kaninchens. I. Mitt.: Eine Methode zur Messung der durch Morphium erzeugte Retentio urinae. Keiô J. Med. **4**, 300 (1933) [A]; Ber. ges. Physiol. **76**, 375 (1934). — Über die Wirkung des Morphins auf die Harnblase des Kaninchens. II. Mitt.:

Über den Einfluß der Morphinmenge auf die Blasenbewegung des Kaninchens in situ. Keiô J. Med. **4**, 306 (1933); Ber. ges. Physiol. **76**, 376 (1934). — Vergleichende Untersuchungen der Wirkung der Opiumalkaloide auf die Blasenbewegung des Kaninchens in situ. Folia pharmacol. jap. **26**, 21 (1938).

Hitati, S.: Über die Wirkung des Morphins auf die Harnblase. Tohoku J. exp. Med. **34**, 72 (1938); Ber. ges. Physiol. **110**, 673 (1939).

Iggo, A.: Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. J. Physiol. (Lond.) **128**, 593 (1955).

Ikoma, T.: Experimentelle Analyse des durch Morphium erzeugten Blasen-Sphinkterkrampfes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **102**, 145 (1924).

Irvin, S., R. W. Houde, D. R. Bennet, L. C. Hendershot and M. H. Seevers: The effects of morphine, methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. J. Pharmacol. exp. Ther. **101**, 132 (1951).

Katsuki, Sh., and H. Ogata: Experimental studies on the inhibitory mechanism of the pons for the small intestinal movements. Kūmamoto med. J. **5**, 86 (1953); Ber. ges. Physiol. **165**, 153 (1954).

Kiessig, H.-J., u. G. Orzechowski: Untersuchungen über die Wirkungsweise der Sympathicomimetica. VIII. Über die Beeinflussung der Schmerzempfindlichkeit durch Sympathicomimetica. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **197**, 391 (1941).

Kleyntjens, F., and O. R. Langworthy: Sensory nerve endings on the smooth muscle of the urinary bladder. J. comp. Neurol. **67**, 367 (1937).

Kolb, L. C., and O. R. Langworthy: A comparative study of the effects of the barbiturates, ether and bulbocapnine on micturition. J. Pharmakol. exp. Ther. **63**, 108 (1938).

Langley, L. L., and J. A. Whiteside: Mechanism of accommodation and tone of urinary bladder. J. Neurophysiol. **19**, 147 (1951).

Langworthy, O. R., and F. R. Hesser: An experimental study of micturition released from cerebral control. Amer. J. Physiol. **115**, 694 (1936). — Reflex versical contraction in the cat after transsection of the spinal cord in the lover lumbar region. Bull. Johns Hopk. Hosp. **60**, 204 (1937).

Langworthy, O. R., and L. C. Kolb: The cephalic control of tone in the musculature of the urinary bladder. Brain **56**, 371 (1933).

Langworthy, O. R., L. C. Kolb and L. G. Lewis: Physiology of Micturition. Baltimore: The William Wilkins Company 1940.

Langworthy, O. R., and E. L. Murphy: Nerve endings in the urinary bladder. J. comp. Neurol. **71**, 487 (1939).

Leersum, E. C. v.: Essai d'explication de la réaction de Herrmann Straub (réaction biologique de la morphine). Arch. néerl. Physiol. **2**, 689 (1918); zit. nach Schaumann, O.: Hdb. d. exper. Pharmakol. Erg. Werk. 12. Bd. 1957.

Levin, P. M., and O. R. Langworthy: Extrapyramidal control of micturition. The effects of lesions of the Tegmentum of the midbrain. Amer. J. Physiol. **118**, 483 (1937).

Loman, J., B. Greenberg and A. Myerson: The effect of Mecholyl, Prostigmine, Benzedrinesulfate and Atropin in the urinary tract. Urographic studies. New Engl. J. Med. **129**, 655 (1938).

Marazzi, A. S.: Some indications of cerebral humoral mechanisms. Science **118**, 367 (1953).

Mellanby, J., and C. L. G. Pratt: The reactions of the urinary bladder of the cat under conditions of constant volume. Proc. roy. Soc. B. **128**, 186 (1940).

Michailow, G.: Über die sensiblen Nervenendigungen in der Harnblase der Säugetiere. Arch. mikr. Anat. **71**, 254 (1908).

Myerson, A., and M. Ritvo: Benzedrine sulfat and its value in spasm of the gastrointestinal tract. J. Amer. med. Ass. **107**, 24 (1936).

Nesbit, R. M., J. Lapides, W. W. Volk, M. Sutler, R. L. Berry, R. H. Lyons, K. N. Campbell and G. K. Moe: The effects of blockade of the autonomic ganglia on the urinary bladder in man. J. Urol. (Baltimore) **57**, 242 (1947).

Niemeyer, Charlotte: Diss. Kiel (noch nicht veröffentlicht).

O'Connor, M. D.: Benzedrine. Brit. med. J. **1**, 43 (1937).

Pellacani, P.: Arch. per le scienz. med. **5**, Nr. 18. — Arch. ital. de Biol. **2**, 302 (1886); zit. nach Poulssen, E.: Hdb. d. exper. Pharmakologie II, 1, S. 363.

Purpura, D. P., and H. Grundfest: Physiological and pharmacological consequences of different synaptic organisations in cerebral and cerebellar cortex of cat. J. Neurophysiol. **20**, 494 (1957).

Ruickoldt, E.: Beiträge zur Kenntnis der Wirkung des Urotropins. I. Mitteilung: Die Wirkung des Urotropins auf die Blase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **171**, 215 (1933).

Schaumann, O.: Morphin und morphinähnlich wirkende Verbindungen. Hdb. d. exper. Pharmakologie, Erg. Werk. XII. Bd., 1957.

Shoji, R.: On the permeability of epithelial layer of the bladder to water and salt. J. Physiol. (Lond.) **54**, 239 (1920).

Soehring, K., u. G. Ergenzinger: Wirkungen von Amphetamin und Derivaten auf zentralnervöse Funktionen. Arzneimittel-Forsch. **5**, 478 (1955).

Sollmann, T.: A manual in pharmacology and its applications to therapeutics and toxikology. Philadelphia and London: W. B. Saunders Comp. 1949.

Stöhr, P. jr.: Über die Innervation der Harnblase und der Samenblase beim Menschen. Z. Anat. Entwickl. Gesch. **78**, 555 (1926).

Struppler, A.: Das Tonusproblem im Licht der neueren Forschung. Dtsch. med. Wschr. **1957**, 653.

Takagi, K., M. Matsumura, A. Yanai and K. Ogiu: The effects of analgesics on the spinal reflex activity of the cat. Jap. J. Pharmacol. **4**, 176 (1955).

Tang, P. C.: Levels of brain stem and diencephalon controlling Micturition reflex. J. Neurophysiol. **18**, 583 (1955).

Tang, P. C., and T. C. Ruch: Non-neurogenic basis of bladder tone. Amer. J. Physiol. **181**, 249 (1955). — Localization of brain stem and diencephalic areas controlling the micturition reflex. J. comp. Neurol. **106**, 213 (1956).

Tappeiner, H.: Über die Einwirkung des Morphins auf die Harnentleerung. Münch. med. Wschr. **1899**, 876.

Uchigaki, Sh.: On the influence of various drugs on the internal pressure of the urinary bladder. Jap. J. Obstet. Gynec. **10**, 47 (1927). Ber. ges. Physiol. **45**, 813 (1928).

Wikler, A.: Sites and mechanisms of action of morphine and related drugs in the central nervous system. Pharmacol. Rev. **2**, 435 (1950).

Winter, I. C.: The action of morphine on the urinary bladder of the unanesthetized dog: A comparison with the action of parasympathicomimetic drugs. J. Urol. (Baltimore) **45**, 388 (1941).

Dr. Friedrich-Karl Ohnesorge, Pharmakologisches Institut der Universität, Kiel, Hospitalstr. 20

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 330—335 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Herstellung geeigneter Gefrierschnitte zur Autoradiographie der Niere in einer Kühlkammer mit eingebautem Mikrotom*

Von
R. Taugner, H. Hole, G. Grigoleit und U. Wagenmann**

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Dezember 1957)

Nach vergeblicher Erprobung bekannter Verfahren (u. a. auch der Gefriertrocknung) wurde 1955 darauf hingewiesen, daß die bis dahin vernachlässigten Gefrierschnitte aus unfixiertem Material sich zur Herstellung brauchbarer Autoradiogramme eignen; durch diese Methode schien vor allem die sonst unumgängliche Gefahr einer Elution und Verschiebung diffusibler Stoffe vermeidbar (Oster, Kundt u. Taugner). Gleichzeitig wurde — neben zahlreichen anderen Problemen der Verteilung wasserlöslicher Isotopenverbindungen und ihres Transports im Organismus — auch die nähere Lokalisation renaler Transportvorgänge im Verlauf einzelner Nephrone exakter histologischer Bearbeitung zugänglich.

Die Gefrierschnitte wurden anfangs — in Anlehnung an die Gefrierschnitt-Technik von Schultz-Brauns — zur Vermeidung des Auftauens in einer größeren, den Menschen einschließenden Kältekammer hergestellt. Die Arbeiten wurden dann aber so lange unterbrochen, bis sie mit dem neuen „Kryostaten[1]" nach Dittes-Duspiva unter technisch wesentlich günstigeren Bedingungen fortgeführt werden konnten: Der Experimentator befindet sich nunmehr lediglich mit Händen und Unterarmen in einer Spezial-Kühlkammer zur Arbeit an einem eingebauten Serienschnitt-Mikrotom. Mit Hilfe einer durch die Kammerwand geführten Welle wird das Mikrotom von außen betrieben. Ein großes, in Kopfhöhe befindliches eis- und dunstfreies Fenster ermöglicht die einwandfreie Beobachtung aller Arbeitsgänge. Angesichts dieser Vorzüge konnte erwartet werden, daß der neue Apparat die routinemäßige Anwendung des früher angegebenen Prinzips ermöglichen würde.

Im vorliegenden soll zunächst nur auf gewisse erhöhte Anforderungen an die Schneidetechnik sowie an die histologische Fixierung und Färbung eingegangen werden, wie sie sich aus unseren autoradiographischen

* I. Mitteilung.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[1] Hersteller Fa. Linde AG. und Jung AG.

Untersuchungen an der Niere ergaben. Dies scheint erforderlich, da die bisher im Zusammenhang mit der Gefrierschnittechnik benutzten histologischen Verfahren für diesen Zweck nicht genügen.

Unsere Erfahrungen an Mäusen, Ratten, Katzen und Hunden wurden im Verlauf von $1^1/_2$ Jahren gesammelt und erstrecken sich auf etwa 2000 Nierenschnitte von 120 Tieren. Die Ergebnisse lassen sich nach informatorischen Vergleichsversuchen aber auch auf Nebennieren, Speicheldrüsen, Magen, Hoden und Trachea übertragen.

Methodik und Ergebnisse

1. Entnahme, Einfrieren und Aufblocken der Organe. Zur Vermeidung von Narkoseeinflüssen auf die später zu untersuchenden renalen Transportvorgänge wurden die Tiere auch schon bei den histologischen Vorarbeiten durch Nackenschlag oder Bolzenschuß betäubt und ausgeblutet. Nach Entfernung der Kapsel wurden 3—5 mm dicke Gewebsscheiben aus dem Querschnitt der Niere gewonnen. Bei Maus und Ratte wurden diese Scheiben ganz, bei Katze und Hund erst nach Excision eines Trapez-förmigen Ausschnitts (Basis äußere Rinde, Höhe 5—10 mm) eingefroren.

Das Einfrieren kann am einfachsten mit CO_2 vorgenommen werden (vgl. Schultz-Brauns). Das Gewebe muß dabei mit Hilfe eines Reagensglases vor unmittelbarer Berührung mit dem CO_2-Schnee geschützt werden, da sonst die unten näher beschriebene „Randschädigung" vergrößert wird.

Für die Zeitspanne des Einfrierens mit CO_2 (rund 3 min) ist mit der Möglichkeit einer postmortalen Verschiebung von wassergelöster Aktivität zu rechnen. Schnelleres Gefrieren verbürgt außerdem bessere Erhaltung feiner Gewebsstrukturen (Vermeidung größerer Eiskristalle und eutektischer Trennung der Gewebsflüssigkeit). Ganz langsames Einfrieren etwa durch Einlegen in die Tiefkühltruhe bei —20° C ist streng zu vermeiden, da es infolge grober histologischer Schädigung sogar zur Verlagerung radioaktiver Substanzen führen kann.

Strengeren Anforderungen entspricht das Einfrieren in flüssiger Luft bzw. in damit gekühltem Isopentan. Da der plötzliche Temperatursprung besonders bei größeren Objekten oft zu makroskopischen Gewebsrissen führt, werden mehrere Gewebsstücke zur Auswahl eingefroren. Aufblocken dann mit Hilfe eines großen Wassertropfens oder schon vor dem Einbringen in Isopentan. Schneidebeginn in jedem Fall erst nach Temperaturausgleich im Kryostaten.

2. Die „Randschädigung". Ohne besondere Schutzmaßnahmen zeigen fast alle Nierenschnitte eine charakteristische Schädigung der Randbezirke, besonders im Bereich der Rinde. Die Tubuluszellen erscheinen an diesen Stellen stärker geschrumpft und färben sich stärker an (Abb. 1). Direkte CO_2-Einwirkung verstärkt die Randschädigung. Ihre Breite hängt sonst offenbar in erster Linie von der Verweildauer des Gewebsblockes im Kryostaten ab. Die Randschädigung dürfte daher durch langsames Austrocknen in der Kühlschrankatmosphäre bedingt sein; sie ist dementsprechend durch Abdeckung mit Vaseline oder Paraffin weitgehend zu verhindern. Man kann das frische Gewebe z. B. mit einer Mischung aus Paraffin. liqu. und Hexan (1:3) bepinseln; das Hexan verdampft rasch und hinterläßt — ohne Nachteile für die Schneidetechnik — einen schützenden Paraffinfilm. Das Gewebe kann beim Einfrieren mit CO_2 auch mit einem Wassermantel, zur Vermeidung späteren Splitterns mit „Aquaffin" gemischt, umgeben werden.

3. Das Schneiden. Da gleichmäßige Betätigung des Mikrotoms für die Herstellung faltenfreier Gefrierschnitte unerläßlich ist, stellten wir es auf maschinellen Antrieb um. Dazu wurde eine Keilriemen-Nute in das Handrad eingedreht und

dieses über einen Elektromotor mit Fußschalter betrieben (Frequenz: 2 Schnitte pro Minute; für wechselnde Geschwindigkeiten: Getriebe eines Jaquet-Photokymographions; Vorteil der automatischen Schnittfolge: Gleichmäßige Austrocknung vom Anschnitt her, konstante Schneidebedingen).

Am Schnittstrecker diente als Streckplatte meist ein halbierter Objektträger mit scharfer Bruchkante (Neigung zur Messerfläche 18°). Dieser gleitet, wenn er anfangs etwas übersteht, nach 1—2 Schnitten selbsttätig in die richtige Position. Noch besser bewährt sich oft, die dem Objekt zugewandte Kante des Objektträgers etwas abzuschleifen. Dadurch werden Verschmutzungen der sonst allzu scharfen Kante, auch Beschädigungen des Gewebes leichter vermieden.

Zur ungestörten Schnittentnahme ließen wir an dem zum Aufklappen des Schnittstreckers dienenden Rändelrad eine Arretierung anbringen. Weiterhin wurde nach unserem Vorschlag am Boden des Schnittstreckers in horizontaler Führung ein zweiter Objektträger zum Auffangen niederfallender Schnitte angebracht. Entfernt man vor dem Einfrieren anhängendes Fettgewebe und speziell bei der Niere die Kapsel, so bleibt das Messer selbst bei längerem Schneiden sauber. Im Bedarfsfall Reinigung mit feinem Pinsel oder einem Silicon-imprägnierten Tuch der Schallplattenindustrie.

Bei guter Technik lassen sich bei —20° bis —24° C Serien von 40—60 10 μ-Schnitten herstellen. Über —18° C kann nicht hinaufgegangen werden, ohne den wesentlichen Vorzug der Methode zu opfern. Die Eintrittsöffnungen des Kryostaten wurden daher durch über die Unterarme gestreifte Schaumgummimanschetten abgedichtet.

Ob die Schneidebedingungen tatsächlich optimal sind, läßt sich makroskopisch nur grob, mikroskopisch am besten mit der Phasenkontrastoptik erkennen. Meist genügt es, einen frisch gewonnenen Schnitt ohne Einschlußmedium zu betrachten. Unter Umständen lassen sich Fixierung und Färbung durch Mikrophotogramme mit Phasenkontrastoptik (Einschlußmedien physiologische NaCl-Lösung oder Glycerin) überhaupt ersetzen.

4. Abnahme und Transport der Schnitte. Die Schnitte werden mit feinen Haarpinseln vom Messer genommen. Um Verluste durch Beschädigung des brüchigen Gewebes oder Niederfallen der Schnitte zu vermeiden, wird ein einfacher, aber außerordentlich wirksamer Kunstgriff verwendet: Man lädt den Pinsel durch Bestreichen mit trockenem Gummi elektrisch auf. Der Schnitt springt dann förmlich vom Messer an den Pinsel und kann sicher transportiert werden. Bei allzu starker Aufladung Berühren der geerdeten Eisenmasse des Mikrotoms.

5. Auflegen und Strecken der Schnitte. Die glattgestrichenen Schnitte liegen den gekühlten Objektträgern meist recht gut an, und es wäre für histologische Zwecke oft ausreichend, sie nun durch Entfernung aus dem Kryostaten aufzutauen. Es kommt jedoch häufig vor, daß die Schnitte sich bei jähem Temperaturwechsel etwas aufrollen und dann beim Auftauen stellenweise in sich zusammenfallen.

Der Schnitt wird daher vor dem Auftauen am besten durch indifferente Flüssigkeiten gestreckt. Wir verwenden hierzu, wie auch bei der Radiographie, auf —20° C gekühltes Hexan. Die Hexanmenge ist so zu bemessen, daß der Schnitt für einen Augenblick überflutet wird. Das Hexan verdampft innerhalb von 20—40 sec und bringt den gestreckten Schnitt in engsten Kontakt mit der Unterlage.

Bei längerer Verweildauer im Kryostaten heben sich einzelne Schnittpartien leicht wieder ab. Dies läßt sich durch geeignete Hexan—Vaseline- oder Hexan—Paraffin-Gemische vermeiden (vgl. TAUGNER u. WAGENMANN).

6. Fixierung der Gefrierschnitte. Die aus dem Kryostaten entnommenen, auf einem Objektträger getauten Präparate müssen zur besseren Haftung zuerst auf Zimmertemperatur gebracht werden.

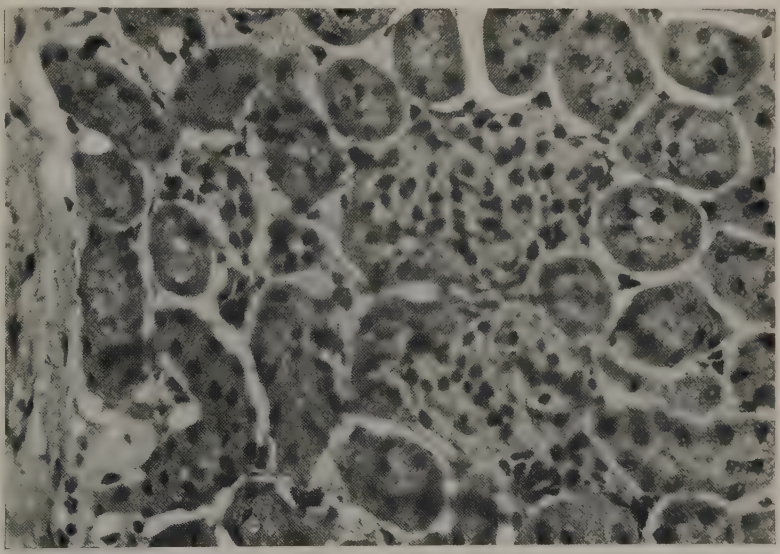


Abb. 1. Gefrierschnitt einer Mäuseniere, mit Formol fixiert. Dicke 10 μ, Vergrößerung 400fach. Fixierung: 8 min 35%iges Formol, anschließend 30 min 4%iges Formol. Hämalaun-Erythrosin-Färbung. Rindenbezirk mit geschrumpften Tubuli und Glomerula. Zusätzliche „Randschädigung" der äußersten Rindenzone (links)

Die von SCHULTZ-BRAUNS angegebene Fixierung, für histologische Zwecke sonst wohl ausreichend, erwies sich für die Niere nicht als optimal. Osmiumtetroxyddämpfe und anschließend 5—50 min 60%iger Alkohol z. B. führten zu starken Schrumpfungen. Nur Glomerula und Nierenmark waren resistanter.

Stärkere Schrumpfungen sind aber für autoradiographische Zwecke zu vermeiden, da sie die Konkordanz zwischen histologischem Bild und radiographischer Schwärzung stören. Es mußte daher in langwierigen Versuchen nach optimalen Fixiermedien gesucht werden.

Bei der oben angeführten Alkoholfixierung schwammen außerdem einzelne Schnitte ab. Bessere Ergebnisse wurden erst erzielt, als die Schnitte nach dem Temperaturausgleich sofort in 96%igen Alkohol kamen (am günstigsten: 5—10 min 96%iger Alkohol, anschließend 30 min 60%iger Alkohol oder 4%iges Formol). Auch bei primärer Formolfixierung waren die Ergebnisse am besten, wenn die Schnitte zuerst in hochprozentige Lösungen kamen. Vorfixierung in 35%igem Formol ($^1/_2$—8 min) und Nachfixierung in 4%igem Formol (30 min) führte zu geringeren Schrumpfungen als die Alkoholfixierung, war jedoch auch noch nicht optimal (Abb. 1).

Erst eine eigens modifizierte konzentrierte Susa-Fixierflüssigkeit führte bei allen Gewebsarten zu brauchbaren Bildern (Sublimat 4,5, NaCl 0,5, Trichloressigsäure 2 g, Eisessig 5 ml, 35%iges Formol ad 100 ml). Ausreichende Fixierung wird damit schon nach 30 min erreicht. 60 min sind optimal (Abb. 2), aber auch 12 Std schädigen die Schnitte nicht.

Die *geringe* Schrumpfung (und gute Haftung) von Gefrierschnitten in *konzentrierten* Medien erklärt sich wohl durch besonders rasche (und nachhaltige) Befestigung auf der Unterlage, sodaß seitliche Verschiebungen nicht mehr möglich sind.

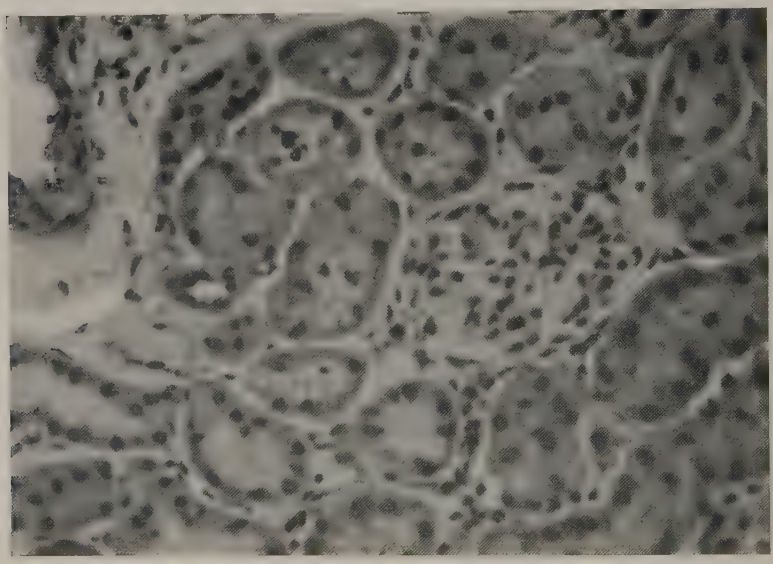


Abb. 2. Gefrierschnitt einer Mäuseniere, fixiert in modifizierter Susa-Lösung. Dicke 10 μ, Vergrößerung 400fach, Aufnahme im Grünlicht. Fixierung: 1 Std modifizierte Susa-Lösung. Hämalaun-Erythrosin-Färbung. Rindenbezirk ohne Schrumpfungen

Im Hinblick auf die Autoradiographie unterscheidet sich aber selbst die Schrumpfung der Gefrierschnitte in weniger geeigneten Fixierlösungen vorteilhaft von der Schrumpfung bei klassischer Fixierung: Während das Gewebe bei dieser in toto schrumpft, entstehen im Gefrierschnitt durch die stellenweise unverrückbare Haftung meist nur Gewebsrisse. Zur Verschiebung von Gewebsteilen wie z.B. ganzer Tubulusabschnitte kann es dabei nicht kommen.

7. Färbung der Gefrierschnitte. Die Schnitte wurden vor jeder Färbung 2mal in 96%igem Alkohol und destilliertem Wasser abgespült. Die Färbbarkeit war nach Fixierung in der modifizierten Susa-Lösung sehr gut. Dies gilt u. a. für Mayersches Hämatoxylin und Erythrosin, Mayersches Hämalaun und 0,1%iges Chromotrop, Elastin, Orcein nach Unna, Kongorot nach Matsuura und die Trichromfärbung nach Masson-Goldner.

Für die Rekonstruktion einzelner Nephrone ist die Abgrenzung der Tubuli durch Darstellung der Basalmembran und des interstitiellen Bindegewebes wünschenswert. Bei Maus und Ratte ist besonders letzteres so zart, daß die Färbung mit Pikroblauschwarz, Nigrosin, Thiazinrot-Pikrinsäure und nach Mallory,

Pasini sowie Del Rio-Hortega (Tannin-Silber) versagte und auch die Azan-Färbung kaum ausreicht. Die besten Ergebnisse lieferte noch folgende, zufällig aufgefundene Kurzfärbung: Mayersches Hämalaun 1 min, Wasser, 0,1%iges Lichtgrün 1 min, Wasser, 96%iger Alkohol 1 min, absoluter Alkohol 2mal je 1 min, Xylol 1 min, Balsam. Ergebnis: Kerne zart rot, Plasma der Tubuli bis auf einen leuchtend grünen Saum kaum tingiert. Vorteil der kurzen Färbezeiten für die Autoradiographie: Bei simultaner Verarbeitung von Film und Schnitt ist die Färbung des Gewebes schon ausreichend, während die Gelatine der Filmemulsion noch nicht störend mitgefärbt wird (vgl. Taugner u. Wagenmann).

Bei Katzen und Hunden ist die Azan-Färbung überlegen.

8. Die Rekonstruktion einzelner Nephrone bei Katzen und Hunden. Entnahme des Gewebsstückchens aus dem die Nierenpapille treffenden Querschnitt; Herstellung lückenloser Serien von etwa 50 Schnitten zu 10 μ; Fixierung mit modifizierter Susa-Lösung für 1 Std, Azan-Färbung. Einglasen, Numerieren der Schnitte, Durchsehen auf fehlerhafte Stellen.

Für die Rekonstruktion bewährte sich der Zeichenapparat von Zeiß besser als der Projektionszeichenspiegel. Vom Harnpol aus wird zunächst das zugehörige Hauptstück verfolgt. Zum Wiederauffinden der betreffenden Schnittpartie dienen charakteristische Strukturen wie etwa Gefäßquerschnitte. Die Zeichnung selbst wird bei 100facher Vergrößerung durchgeführt. Zur genauen Ausrichtung des Bildes dienen angeschnittene Glomerula im gleichen Gesichtsfeld. Der zu verfolgende Tubulus wird zusammen mit diesen auf Transparentpapier gezeichnet. Diese Skizze kann zur Identifizierung des betreffenden Tubulus probeweise mit dem Originalbild des nächsten Schnittes zur Deckung gebracht werden. Durch Übereinanderlegen mehrerer Skizzen läßt sich der Verlauf des Tubulus später festlegen. Die Innenzone des Nierenmarks enthält nur dünne Schleifenanteile und Sammelrohre, so daß hier die Verfolgung eines bestimmten Nephrons schwierig, aber meist auch entbehrlich sein wird. Schaltstück und dicker Teil der Henleschen Schleife sowie das zugehörige Sammelrohr lassen sich von der Macula densa des Ursprungsglomerulum aus rekonstruieren. Zur Frage der Zuordnung von Autoradiogramm und histologischem Schnitt siehe Taugner u. Wagenmann.

Zusammenfassung

Es werden Verfahren zur Herstellung von Gefrierschnitten in einer Tiefkühltruhe mit eingebautem Mikrotom beschrieben. Neben allgemeinen histologischen Gesichtspunkten wird besonders die Verwendbarkeit solcher Schnitte für die Autoradiographie der Niere berücksichtigt.

Literatur

Duspiva, F.: Enzymatische Histochemie, in Handb. physiol.-pathol.-chem. Analyse, Bd. 2, S. 372. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.

Oster, H., H.-W. Kundt u. R. Taugner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 476 (1955).

Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz-Verlag 1948.

Schultz-Brauns, O.: Klin. Wschr. **1931**, 113. — Zbl. Path. **54**, 225 (1932).

Taugner, R., u. U. Wagenmann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 336 (1958).

Priv.-Doz. Dr. R. Taugner,
Pharmakologisches Institut der Univ., Heidelberg, Hauptstr. 47/51

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 336–342 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Serienmäßige Herstellung von Gefrierschnitt-Autoradiogrammen mit optimalem Kontakt*

Von

R. Taugner und U. Wagenmann
unter Mitarbeit von H. Hole, G. Grigoleit, R. Droh und J. Gillissen**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Januar 1958)

Nach enttäuschenden Ergebnissen mit den herkömmlichen autoradiographischen Methoden einschließlich der Gefriertrocknung konnte früher wahrscheinlich gemacht werden, daß Gefrierschnitte zur einwandfreien Lokalisation wasserlöslicher Isotopenverbindungen und daher auch zur Untersuchung tubulärer Transportvorgänge geeignet sind (Oster, Kundt u. Taugner). In der seinerzeit verwendeten Klimakammer war die serienmäßige Herstellung faltenfreier, gut gestreckter Schnitte allerdings nicht möglich. In einer Spezial-Kühlkammer mit eingebautem Mikrotom lassen sich neuerdings lückenlose Gefrierschnittserien herstellen (Taugner, Hole, Grigoleit u. Wagenmann). Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel, diese verbesserten Bedingungen nun auch für die Gefrierschnitt-Autoradiographie nutzbar zu machen. Dabei sollte vor allem nach zuverlässigen Methoden zur Streckung der Schnitte und serienmäßigen Herstellung von Radiogrammen für die Rekonstruktion des Nephrons gesucht werden. Die folgenden methodischen Ausführungen demonstrieren an Hand von 850 Radiogrammen, daß die verbesserte Gefrierschnitt-Autoradiographie diesen Anforderungen genügt.

Filmmaterial. Strippingfilm- und Coating-Verfahren kommen für die Darstellung wasserlöslicher Aktivität nicht in Frage, da sie ohne Auftauen und wäßrige Durchtränkung der Schnitte nicht durchführbar sind. Für die Kontakt- und Mounting-Methode an Gefrierschnitten eignen sich die sogenannten Nuclear Track Plates, für die Darstellung von S^{35}, J^{131} und P^{32} speziell die Typen NTB und NTB-2 (Eastman Kodak) in der Größe von Objektträgern und einer Schichtdicke von 10 μ. Hinsichtlich des Auflösungsvermögens im Bereich einzelner Tubuli sind NTB- und NTB-2-Platten nicht wesentlich verschieden, die empfindlichere NTB-2-Emulsion ist daher vorzuziehen. Die Intensität der Schwärzungen wurde durch Exposition in Gegenwart von P_2O_5 nicht gesteigert; die Kühlschrankatmosphäre sorgt offenbar an sich schon für ausreichende Trockenhaltung der Emulsion.

* II. Mitteilung. Im Anschluß an die vorangegangene Untersuchung, siehe Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 330 (1958).

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Isotopendosen, Gewinnung und Einfrieren des Gewebes. Die Expositionszeit wurde während der methodischen Vorversuche zum Teil durch Injektion größerer Aktivitätsmengen auf 4—7 Tage verkürzt (vgl. Abb. 1—4). Späterhin injizierten wir nur so viel Aktivität, daß die Filmschwärzung erst nach 1—$1^1/_2$ Halbwertszeiten ausreichend war. Alle Präparate waren trägerfrei.

Die Tiere wurden 5 min bis 14 Std nach der i.v. Injektion getötet. Die Betäubung erfolgte bei Mäusen und Ratten durch Nackenschlag, bei Katzen und Hunden durch Bolzenschuß. Entblutung, Organentnahme, Abtrennung geeigneter Gewebsstücke und Einfrieren sind an anderer Stelle beschrieben (Taugner u. Mitarb.).

Herstellung, Transport und Aufbringen der Gefrierschnitte im Rotlicht. Einwandfreie Gefrierschnittserien wurden bei —22° bis —18° C im „Kryostaten" (System Dittes-Duspiva[1]) hergestellt und mit elektrisch aufgeladenen Haarpinseln transportiert. Speziell dieser Kunstgriff erlaubt kontinuierliches Arbeiten bei Rotlicht. Wir befestigten an der Decke des Kryostaten eine 25 Watt-Birne hinter einem Kodak-Wratten-Filter, Serie 2 (dunkelrot, 13×18 cm); die Helligkeit ist von außen mit Hilfe eines Schiebewiderstandes variierbar. Die Entfernung der Rotlichtquelle vom Arbeitsplatz beträgt etwa 30 cm. Dabei ist die Sicht ausreichend, die Belichtung der Emulsion und die Erwärmung des Arbeitsplatzes zu vernachlässigen. Sollte die Normalbeleuchtung zwischendurch doch eingeschaltet werden müssen, so ist die eingebaute nachleuchtende Neonröhre durch eine Soffittenlampe zu ersetzen.

Autoradiographische Bestimmung der Aktivität in Blut und Urin. Zum Vergleich mit der Aktivität einzelner Gewebsstrukturen wurden auch Urin- und Plasmaproben eingefroren und genau wie Nierengewebe radiographiert. Der Urin kann — nach Bestimmung des spezifischen Gewichts und damit des Funktionszustandes der Nieren — zur Verbesserung der Schneidbarkeit mit dem Carbowachs Aquaffin im Verhältnis 1:1 gemischt werden.

Das Strecken der Schnitte auf der Filmplatte. Optimaler Kontakt erfordert die zuverlässige Streckung der zum Teil gewellten und aufgerollten Schnitte auf der Filmplatte. Dieses zentrale Problem konnte für die Gefrierschnittechnik erst nach mühevollen Vorversuchen gelöst werden.

Die frischen Schnitte können auch auf einem Objektträger gestreckt werden. In diesem Fall muß dann in einem 2. Arbeitsgang der Film aufgelegt werden. Dieses Verfahren ist — neben anderen Nachteilen — umständlich und kommt nur für spezielle Problemstellungen in Betracht.

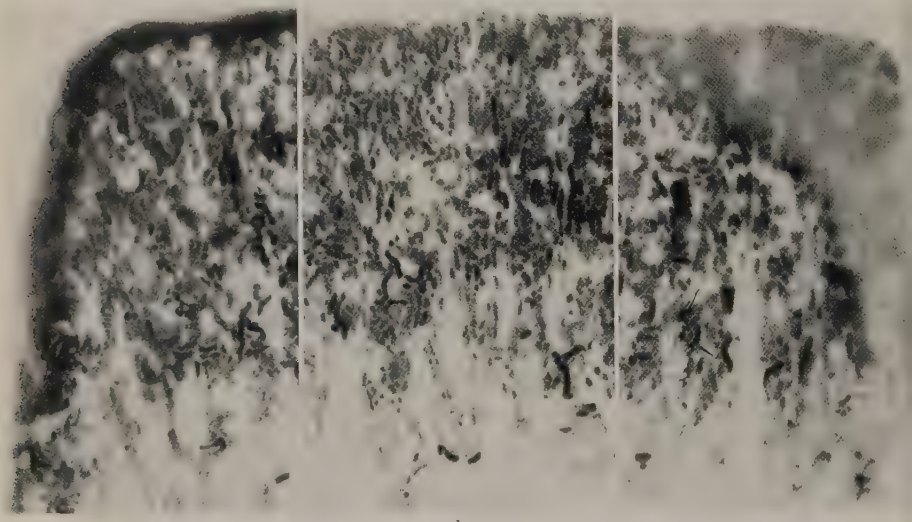
1. *Sofortiges Glattstreichen der Schnitte* auf dem Film mittels Haarpinsel ergab stets nur diffuse Schwärzungen. Die Schnitte lagen offenbar nicht eng genug an.

2. Auch die *Anwendung von Druck* nach vorausgehendem Glattstreichen bewirkt — infolge peristierender Schnittfalten — meist keinen ausreichenden Kontakt. Zu hohe Drucke führen, wahrscheinlich durch Verflüssigung, zur Umlagerung der Aktivität, unter Umständen auch zur Beschädigung der Schnitte. Verwendet wurden — auf geschliffenen

[1] Hersteller Fa. Linde AG. und Jung AG.

Objektträgern, Deckgläschen oder kleinen Gummistücken — Büro- und Wäscheklammern, Stahlclips, Schraubzwingen und Bleigewichte, zum Teil erst nach Trocknung der Schnitte auf Film oder Objektträger.

3. *Kurzes Auftauen* durch Berühren der Filmrückseite führte gewöhnlich über größeren Schnittbereichen zu differenzierten Bildern. Die übrigen Stellen waren auch intensiv, aber diffus geschwärzt, die Gesamtfläche des Bildes deutlich verkleinert (Abb. 1a). Das Gewebe fällt offen-



a b c

Abb. 1. Autoradiogramme von Nierengefrierschnitten der Katze. Ausschnitte: Rinde und äußere Markzone; freier Nierenrand oben. Niere entnommen 15 min nach i.v. Injektion von 25 mC/kg P^{32} als $Na_3P^{32}O_4$. Expositionsdauer 4 Tage. Schnittdicke 10 μ. Vergrößerung 20fach. a Schnitt gestreckt durch kurzes Auftauen auf dem Film. Differenzierte Zeichnung wird gegen die Schnittränder hin weniger deutlich. Zusammengefallene Ränder intensiv geschwärzt. b Schnitt gestreckt mit Hexan. Differenzierte Zeichnung. c Derselbe Schnitt wie b. Diffuse, schwächere Schwärzung im Bereich einer sekundären Randabhebung

bar während des Tauens im Bereich nicht aufliegender Partien in sich zusammen. Wurde der Schnitt auf einem Objektträger oder Deckglas getaut und dann erst auf den Film gelegt, so entstanden wegen dieser groben Faltenbildung meist nur völlig diffuse Bilder. Wird das Auftauen richtig durchgeführt, so können derartige Radiogramme, wenn sie mit Kontrollversuchen ohne Auftauen übereinstimmen, zur Bewertung anderer Streckverfahren dienen.

4. *Die Streckung mit dünnflüssigen, schwerflüchtigen Medien* wie Decan-Paraffin-Gemischen oder Siliconölen (zum Schutz der Filmemulsion vor Feuchtigkeit und Verhütung der Schnitt-Austrocknung) führte auch in Kombination mit Druck nicht zu brauchbaren Ergebnissen.

5. *Die Streckung mit flüssigen, bei —24° C noch leicht flüchtigen Medien*, vor allem mit Hexan, aber auch mit Heptan, Oktan und flüchtigen Siliconölen lieferte regelmäßig differenzierte Bilder (Abb. 1b). Nach sorgfältiger Ausbreitung des Schnittes auf dem Film wird gerade soviel Hexan aufgebracht, daß der Schnitt für kurze Zeit überflutet ist. Die Flüssigkeit verdampft dann und bringt den Schnitt in engen Kontakt mit der Emulsion (vgl. TAUGNER u. Mitarb.). Bei diesem Verfahren kommt es allerdings — auch bei zusätzlicher Applikation von Druck — fast regelmäßig zur Wiederabhebung einzelner Partien, besonders am Schnittrand (Abb. 1c).

6. *Bei Streckung durch Flüssigkeitsgemische mit gleichzeitiger Klebwirkung* ist die Gefahr nachträglicher Abhebung behoben. Die Streckung erfolgt durch eine dünnflüssige, flüchtige Komponente, während der zweite zähflüssige Stoff zurückbleibt und den Schnitt auf dem Film festhält. Die geringe Schichtdicke dieses Klebemittels stört den Kontakt nicht. Optimal und besser als entsprechende Hexan—Vaselin-Gemische waren Hexan und Paraff. liqu. im Verhältnis 10:1 bis 30:1 (Abb. 2 u. 3).

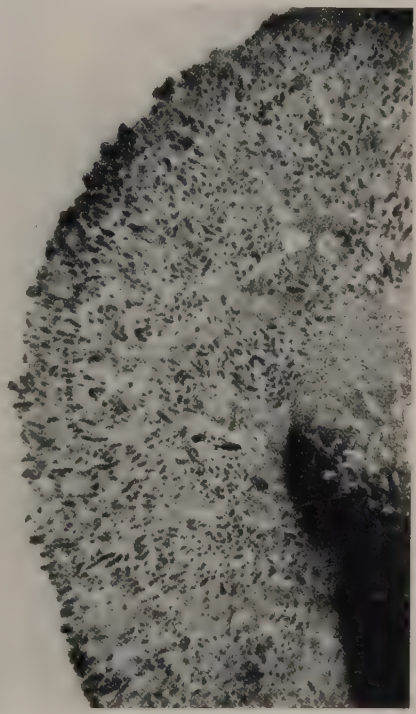


Abb. 2. Autoradiogramm eines Nierengefrierschnitts von der Maus. Ausschnitt: Rinde, Mark mit Papillenteil. Schnitt gestreckt mit Hexan-Paraffin. liq.-Gemisch 5:1. Gleichmäßig differenzierte Zeichnung über das ganze Bild. Niere entnommen $7^1/_4$ Std nach i.p. Injektion von 10 mC/kg S^{35} als $Na_2S^{35}O_4$. Expositionsdauer 7 Tage. Schnittdicke 10 μ. Vergrößerung 26fach

Von den geschilderten Verfahren erwies sich demnach Methode 6, d. h. die Streckung durch flüssige Medien mit gleichzeitiger Klebwirkung, als optimal. Sie wird daher zunächst als Routinemethode verwendet. Bis zum Vorliegen ausreichender Erfahrung sind jedoch Kontrollversuche ohne Anwendung flüchtiger Paraffine geraten.

Die niedrigen Kohlenwasserstoffe sind ebenso wie die flüchtigen Siliconöle fettlöslich. Es wäre möglich, daß mit Gewebsfetten auch Teile der Aktivität dislociert werden. Gegen die Bedeutung dieser Fehlermöglichkeit sprechen allerdings folgende Gründe: 1. Das aufgebrachte Hexan verdampft innerhalb weniger Sekunden. 2. Die mit flüchtigen Streckmitteln gewonnenen Radiogramme stimmten mit den nach anderen Verfahren gewonnenen Bildern überein, soweit in letzterem Fall

überhaupt ausreichender Kontakt erzielt werden konnte. 3. Hexan, das über die Schnittränder hinauslief, hinterließ in keinem Fall Schwärzungen des Films als Anzeichen herausgelöster Aktivität, wie dies z. B. bei Verwendung wäßriger Medien nach herkömmlicher histologischer Aufarbeitung des Gewebes typisch ist (vgl. Oster, Kundt u. Taugner). 4. Dies war selbst dann nicht der Fall, wenn das auf den Schnitt gebrachte Hexan in Kontrollversuchen mit Hilfe eines Vaselinumrandeten Deckgläschens am Verdampfen gehindert wurde und so bis zu 14 Tagen auf dem Gewebe verblieb.

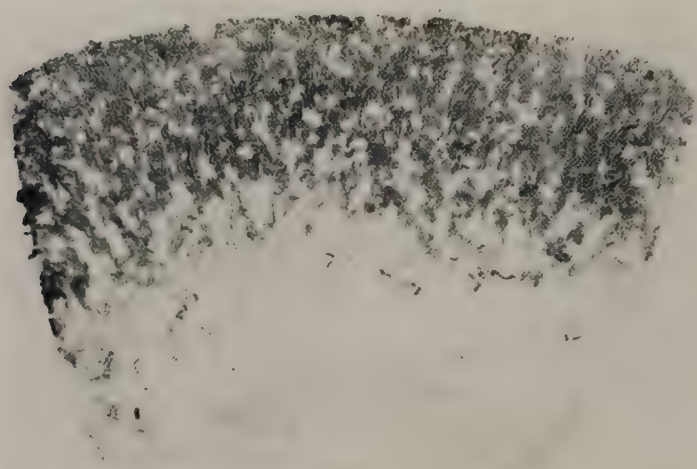


Abb. 3. Autoradiogramm eines Nierengefrierschnitts von der Katze. Rinde und äußere Markzone. Freier Nierenrand oben. Schnitt gestreckt mit Hexan—Vaselin-Gemisch 20:1. Guter Kontakt über die ganze Ausdehnung des Präparates. Technische Daten siehe Legende von Abb. 1. Vergrößerung 13fach

Exposition der beschickten Filmplatten außerhalb des Kryostaten. Die Filmplatten wurden mit den gestreckten Schnitten in vorgekühlte Zinkblech- oder Kunststoffkassetten ($5 \times 7 \times 10$ cm) gebracht, in eine 2. Tiefkühltruhe transportiert und lichtgeschützt (unter Umständen auch im Desiccator) bei $-18°$ bis $-20°$ C zur Exposition gelagert. Kontrollmessungen mit Thermoelement ergaben, daß die Temperatur in den Kassetten beim Transport konstant blieb. Ein Holzrost mit 3—4 Längsrillen dient zur Unterbringung mehrerer Filme.

Während der Exposition kommt es in der Kühlschrankatmosphäre innerhalb von Stunden zur Sublimation des im Schnitt befindlichen Eises. Dadurch entstehen zwei Fehlermöglichkeiten: 1. Auftreten flüssiger Phasen durch Konzentrierung der Gewebselektrolyte und 2. kleiner Risse im Gewebe. Das Ausmaß möglicher Aktivitätsverschiebungen durch nachträgliche Verflüssigung läßt sich schwer abschätzen, da die Verhältnisse bei der Gefriertrocknung tierischer Gewebe außerordentlich kompliziert sind (vgl. Neumann). Obwohl unsere Radiogramme keinerlei Anhaltspunkte für eine Verlagerung der Aktivität ergeben, wurden entsprechende Kontrollversuche angesetzt. Dabei soll die Austrocknung und damit die Bildung flüssiger

Phasen verhindert bzw. das histologische Bild während des Austrocknens fortlaufend mikroskopisch kontrolliert werden. Derartige Kontrollen sind zunächst für jedes neue Experiment zur Lokalisation tubulärer Transportvorgänge zu fordern. Histochemographische Artefakte im Sinne von Boyd u. Board wurden durch Leerversuche ohne Isotopeninjektion ausgeschlossen.

Photographische Entwicklung. Der exponierte Film wurde in Xylol, unter Umständen mit einem breiten Haarpinsel von Schnitt und Paraffin-Resten befreit. Anschließend Alkoholspülung. Entwickler nach der Kodak-Formel D. 19 b, „Metol" anstatt „Elon". Entwicklungsdauer $^1/_2$—7 min.

Zuordnung des Autoradiogramms zum histologischen Schnitt. Für die Auswertung von Autoradiogrammen ist meist ihre Zuordnung zu den Strukturen eines histologischen Vergleichsbildes notwendig.

Dies ist in idealer Weise möglich, wenn der zur Erzeugung des Autoradiogramms benutzte Schnitt während der photographischen Prozeduren auf dem Film verbleibt und anschließend — ohne Lage- und Größenveränderungen — histologisch gefärbt wird. Bei Schnitten aus fixiertem und eingebettetem Gewebe ist dies, wenn auch oft mit komplizierten Verfahren, möglich (vgl. Boyd). Bei der Gefrierschnittechnik dagegen müßte der Schnitt vor jeder weiteren Verarbeitung zuerst histologisch fixiert werden. An dieser Forderung scheint aber die Simultanverarbeitung von Gefrierschnitt und Film zu scheitern. So schwimmen z. B. Schnitte, die nicht durch Auftauen an der Emulsion kleben, in den Fixierflüssigkeiten ab. Aber selbst nach dem — methodisch nicht unbedenklichen — Auftauen ist die Haftung des Gewebes am Film unzureichend und das histologische Ergebnis daher wesentlich schlechter als bei Streckung und Fixierung auf einfachen Objektträgern. Zahlreiche Fixiermedien schädigen außerdem die photographische Emulsion.

Diese grundsätzlichen Schwierigkeiten spiegeln sich in einzelnen Erfahrungen wieder. So wurde der Gelatinefilm schon nach kurzer Einwirkungsdauer von der früher angegebenen optimalen Fixierflüssigkeit, einer modifizierten Susa-Lösung, zerstört (vgl. Taugner u. Mitarb.). Wurden aus dieser Lösung nur Formalin und Sublimat beibehalten, so fanden sich im entwickelten Film bei intakter Gelatineschicht zahlreiche Kunstprodukte. Formolfixierung schädigte die Gelatine nicht sichtbar, schwächte aber, wie die Parallelentwicklung von Vergleichsfilmen zeigte, das Bild ab. Auch war das histologische Ergebnis hier unbefriedigend. Die früher erprobte Alkoholfixierung und Aceton schädigten selbst bei längerer Einwirkung den Film nicht. Das histologische Resultat war jedoch hier besonders schlecht.

Man kann Schnitt und Film nach Beendigung der Exposition auch voneinander trennen, einzeln histologisch bzw. photographisch behandeln, schließlich erneut aufeinanderlegen und unter dem Mikroskop zur Deckung bringen. Der Gefrierschnitt läßt sich allerdings nur dann unbeschädigt vom Film abheben, wenn er durch Auftauen primär fest auf einer Unterlage fixiert wird. Als Unterlagen dienten 20—30 μ dicke Glimmerplättchen. Die Schnitte wurden auf ihnen durch kurzdauerndes Auftauen befestigt und anschließend mit Hilfe flüssiger Medien auf dem Film „gestreckt". Die Biegsamkeit des Glimmers reichte aber nicht aus, um die Sperrwirkung randnaher Gewebsfalten, wie sie beim Auftauen entstehen können, auf kleinstem Raum zu lokalisieren. Die Radiogramme wiesen daher meist nur stellenweise gute Zeichnungen auf.

Für viele Zwecke, so auch für die Zuordnung autoradiographischer Einzelheiten zu bestimmten Abschnitten des histologisch rekonstruierten Nephrons, genügt es, wenn Autoradiogramm und histologisches Bild getrennt aus Nachbarschnitten gewonnen werden. Nach gesonderter

Verarbeitung mit optimaler Methodik befindet sich das Autoradiogramm schließlich auf der Filmplatte, der gefärbte Schnitt auf einem Objektträger. Beide können dann unter dem Mikroskop zur Deckung gebracht werden. Dieses Verfahren ist aus folgenden Gründen möglich: 1. Gefrierschnitte sind starr genug, um während des Schneidens und Streckens ihre Form bis in Einzelheiten zu bewahren. 2. Die Streckung der Schnitte mit Hexan u. ä. gewährleistet vollständige Ausbreitung. 3. Nach der Streckung verschiebt sich der zur Autoradiographie verwendete Schnitt auf dem Film nicht mehr. 4. Auch die histologische Weiterverarbeitung bewirkt am Nachbarschnitt bei geeigneter Technik keinerlei Schrumpfung (Taugner, Hole, Grigoleit u. Wagenmann). 5. Der histologische Schnitt wird an Stelle eines Deckglases mit einem Glimmerplättchen von 20—30 μ Dicke abgedeckt, der zur Autoradiographie verwendete Nachbarschnitt aber zunächst umgewendet und dann erst auf die Emulsion gebracht, so daß Autoradiogramm und Schnitt später, nur durch das Glimmerplättchen getrennt, seitenrichtig aufeinander gelegt werden können. Der Objektträger wird dann auf einem drehbaren Objekttisch befestigt; die Filmplatte kann mit einem fixen, um die Dicke des darunterliegenden Objektträgers erhöht laufenden Kreuztisch verschoben werden. Die grobe Einstellung erfolgt an Hand der Bildränder, die Feineinstellung mittels eindeutiger Bildelemente, z. B. der Glomerula. Film und Objektträger können schließlich zur Vermeidung wiederholter Justierung mit Hilfe von Canadabalsam u. ä. aneinander befestigt werden.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur serienmäßigen Herstellung von Autoradiogrammen aus Gefrierschnitten angegeben. Optimaler Kontakt zwischen Schnitt und Film wird dabei durch die Verwendung spezieller Streckmittel erzielt.

Literatur

Boyd, G. A.: Autoradiography in biology and medicine. New York: Academic Press. Inc. 1955.

Boyd, G. A., and F. A. Board: Science **110**, 586 (1943).

Neumann, K. H.: Grundriß der Gefriertrocknung. Göttingen-Frankfurt-Berlin: Musterschmidt Wissenschaftlicher Verlag 1955.

Oster, H., H. W. Kundt u. R. Taugner: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 476 (1955).

Taugner, R., H. Hole, G. Grigoleit u. U. Wagenmann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 330 (1958).

Priv.-Doz. Dr. R. Taugner, Pharmakologisches Institut der Univ., Heidelberg Hauptstr. 47/51

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 343—351 (1958)

Aus der Pharmakologischen Abteilung des Karolinska Institutes, Stockholm-60 und dem Apotekens Kontrollaboratorium, Stockholm-K.

Atropin- und Stramoniumzigaretten

Von

O. Ervenius, B. Holmstedt und O. Wallén

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 24. Mai 1958)

Eine der ältesten Formen der Arzneimittelbehandlung in Ärosolform ist die Inhalation des Rauches brennender Blätter von Datura stramonium oder anderer Daturaarten. Der Rauch ist ein verhältnismäßig homogenes Ärosol mit sehr kleinem Partikeldurchmesser (Holmstedt u. Wallén 1958). Die Partikel bilden sich nach dem Kondensationsprinzip. Ihre Größe liegt unter 1 Mikron, welches sie befähigt, leicht in die feinsten Verzweigungen der Luftwege einzudringen. In der Medizin ist seit 150 Jahren bekannt, daß der Rauch brennender Stramoniumblätter oft einen günstigen Effekt bei Asthmaanfällen besitzt. Übersichtsartikel über die Anwendungsmöglichkeiten von Folia stramonii wurden von Finnegan (1950) und Bouaziz (1954) veröffentlicht.

Das wirksame Prinzip im Rauch sind die Tropaalkaloide. Der Alkaloidgehalt im Stramoniumblatt variiert gewöhnlich zwischen 0,25—0,50% und besteht in der Hauptsache aus l-Hyoscyamin, welches relativ instabil ist und leicht zu Atropin racemisiert. Beim Durchgang der Literatur fällt auf, daß wenig bekannt ist über die Analyse und Resorption des Rauches von brennenden Stramoniumblättern in Pulverform und überhaupt nichts über den Rauch von Asthmazigaretten. Frühere Versuche, den Alkaloidgehalt im Rauch von Stramoniumblättern zu ermitteln, waren in der Weise durchgeführt worden, daß man den Rauch durch Waschflaschen saugte und den Gehalt der aktiven Substanz in der Flüssigkeit biologisch bestimmte (Hirn 1903, Günther 1911, Tönnesen 1948, Terp 1948). Die in diesen Untersuchungen gewonnenen Werte sind mit größter Wahrscheinlichkeit zu gering, was zum Teil dadurch bedingt ist, daß die kleinsten Partikel in den Ärosolen unbeeinflußt die Waschflaschen passieren können (Dautrebande 1952).

Zu den vielen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten des Atropins wurde auch dessen Antidot-Wirkung bei Vergiftungen mit cholinesterasehemmenden Stoffen, welche zur Gruppe der organischen Phosphorverbindungen gehören, von Bedeutung. Dazu zählen unter anderem insecticide Mittel und Kampfgase. Hier ist die schnelle Zuführung von Atropin lebenswichtig, wobei die Inhalation eines Atropin-Ärosols gewisse Möglichkeiten einer raschen Atropinresorption zu

enthalten scheint. Wir haben es daher für angezeigt gehalten, den Atropinertrag beim Rauchen von Zigaretten, denen bestimmte Mengen dieses Stoffes zugesetzt waren, zu untersuchen. Anschließend hierzu haben wir auch entsprechende Analysen über den Rauch einer im Handel vorkommenden Asthmazigarette vorgenommen.

Methodik

A. Herstellung der Zigaretten

Für die Herstellung von Atropinzigaretten wurde Zigarrentabak mit niedrigem Nicotingehalt (0,06%) verwandt. Dieser wurde von der AB Svenska Tobaksmonopolet zur Verfügung gestellt. Der feingeschnittene Tabak wurde mit einer Lösung von Atropinsulfat in Alkohol befeuchtet, wonach der Alkohol unter mehrfachem Umrühren des Tabaks wieder verdunsten konnte. Insgesamt wurden drei verschieden starke Präparate bereitet. Die Zigaretten wurden auf folgende Weise hergestellt: Zigarettenhülsen mit Papiermundstück (Typ Troja, schwedisches Tobaksmonopol) wurden erst mit einem kleinen Wattebäuschchen gedichtet und dann mit 200 mg des so bereiteten Tabaks gefüllt.

Die Stärke der vorgenannten Mischungen wurde so abgepaßt, daß die Zigaretten 5, 10 oder 20 mg Atropinsulfat enthielten.

Die für die Untersuchung verwandten Asthmazigaretten stammten aus schwedischer Produktion und enthielten im Durchschnitt 1,04 mg feingeschnittene Stramoniumblätter und waren mit Wattefilter versehen. Der Alkaloidgehalt der getrockneten Droge wurde laut der schwedischen Pharmakopoe Ed. XI auf 0,352% bestimmt. Der Feuchtigkeitsgehalt lag bei 7,9%. Jede Zigarette enthielt im Durchschnitt 4,06 mg Alkaloid (berechnet als Atropinsulfat).

B. Rauchmethodik und Sammeln des Rauches

In der Tabaksindustrie werden für Untersuchungszwecke die Zigaretten gewöhnlich unter Zuhilfenahme von Apparaten mit intermittierendem Saugen „geraucht". Dabei wird der Rauch in einem Glasgefäß mit Lösungsmittel absorbiert oder, nach Baumberger (1923), mittels Elektrofilter gesammelt.

Elektrofilter (Cottrellfilter) haben bestimmte Vorteile (Abb. 1). Ihr Prinzip besteht darin, daß der Rauch ein elektrisches Feld passiert. Zwischen einem zentral gelegenen Metalldraht und einem umhüllenden Metallzylinder liegt eine Spannung von etwa 8 KV. Die Luftpartikel, welche dieses elektrische Feld passieren, werden elektrisch geladen und sammeln sich entweder an der Wand des Zylinders oder auf der Zentralelektrode. Beim Rauchen wird die Zigarette an dem einen Ende des Filters befestigt, wonach die Versuchsperson durch einen mit einem Zigarettenmundstück versehenen Schlauch, der an dem anderen Ende des Filters angebracht ist, die Zigarette auf gewöhnliche Weise rauchen kann (Wilner 1951). Für die Bestimmung des Alkaloidgehaltes in der Ausatmungsluft wurde ein größeres Cottrellfilter mit einem Durchmesser von 3 cm und einer Spannung von 12 KV verwandt.

Die Größe der Atropinretention während des Rauchens wurde auf folgende Weise bestimmt. Zigaretten, deren Rauch einen Alkaloidgehalt von 1,45 mg Alkaloid (berechnet als Atropinsulfat) enthielten, wurden rasch geraucht (ein Zug alle 10—15 sec) und die Ausatmungsluft dabei durch das größere Cottrellfilter geleitet.

C. Analysenmethodik

Die Cottrellfilter wurden mit Chloroform in Portionen von 15 ml gewaschen. Die Lösungen wurden in einem Meßkolben von 100 ml gesammelt und mit Chloroform bis zur Marke gefüllt. Eine ausreichende Menge dieser Lösung wurde mit

Hilfe der Verteilungschromatographie nach Schill u. Ågren (1951) gereinigt. Hierbei passierten 50—100 ml der atropinhaltigen Chloroformlösung eine Säule von saurem Kieselgur, in welcher das Atropin sowie ein Teil der Verunreinigungen festgehalten wurden. Nachdem die Chloroformlösung die Säule mit einer Geschwindigkeit von 2—3 ml/min passiert hatte, wurde mit etwa 100 ml Chloroform nachgespült.

Die Herstellung der Säule geschah folgendermaßen: 15 g Kieselgur wurden in einer Porzellanschale sorgfältig mit 4,0 ml Phosphorsäure M/2 gemischt. 2 g dieser Mischung wurden in Chloroform verrührt und in ein mit Hahn versehenes 10 mm dickes Glasrohr, auf dessen Boden Glaswolle lag, gefüllt.

Die Säule wurde mit etwa 100 ml ammoniakalischem Chloroform eluiert, welches durch Schütteln von Chloroform mit der halben Menge konzentrierten Ammoniaks bereitet worden war. Das Eluat passierte danach eine Säule mit 2 g Aluminiumoxyd, welches in einem Rohr, das dem bereits früher beschriebenen glich, untergebracht war. Das Atropin passierte diese Säule, während die Verunreinigungen, welche aus der ersten Säule durch die Eluation herausgelöst waren, zum überwiegenden Teil an das Aluminiumoxyd adsorbiert wurden. Das Eluat wurde in einem 100 ml Meßkolben gesammelt. Daraus wurde eine Menge von etwa 50 μg Atropin entnommen, die in einer Glasschale im Wasserbad eindunstete. Sofort nach dem Verdunsten des Chloroforms und Abkühlen der Glasschale wurden 0,2 ml rote rauchende Salpetersäure zugesetzt. Danach wurde die Schale im Wasserbad erneut erwärmt, bis die Salpetersäure nicht mehr gerochen werden konnte (etwa 3 min). Das Reaktionsprodukt wurde in Aceton, welches mit 2 Vol-% absoluten Alkohol versetzt war, gelöst, und quantitativ in einen 10 ml-Meßkolben überführt. In diesen wurden 3 Tropfen einer 3%igen Lösung von Kaliumhydroxyd in Methanol zugegeben, danach mehrmaliges Wenden des Kolbens. Nach 45 sec wurde die Farbenintensität im Beckman-Photometer, Modell B bei 575 mμ gemessen. Die Standardkurve für Atropinsulfat wurde in gleicher Weise aufgenommen.

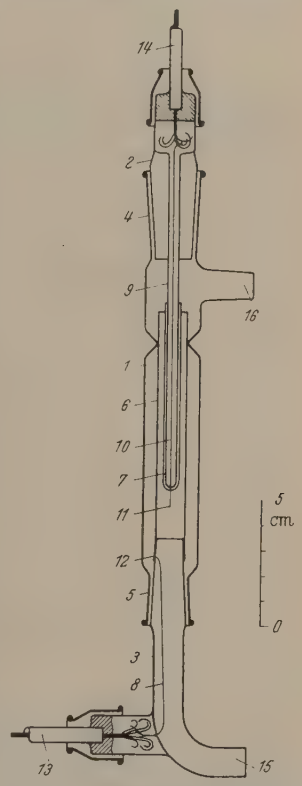


Abb. 1. Cottrellfilter nach Wilner

Die Abbildung enthält einen schematischen Querschnitt des Filters. Die äußeren Teile *1*, *2* und *3* bestehen aus Glas und sind durch die Konusstücke *4* und *5* derart verbunden, daß sie zur Reinigung leicht auseinander genommen werden können. 0,05 — 0,10 mm dicke Silber- oder Platinfolien bilden die Zylinder-Elektroden *6* und *7*. Die äußere Elektrode *6* ist dem oberen Teil von Konus *5* fest aufgesetzt und bei *12* mit dem in Glas eingeschmolzenen Platindraht *8* verlötet, dessen weitere elektrische Leitung über das Kabel *13* läuft. Die innere Elektrode *7* sitzt auf der Außenwand von Glasröhre *9*, die vom Glasteil *2* nach unten geführt und an ihrem Ende verschlossen ist. Sie wird von einem aus Kabel *14* abgehenden 0,35 mm dicken Platindraht *10* durchzogen, welcher aus einem kleinen Loch in der Elektrode *7* herausragt und mit der Entladungsstrecke *11* endet. Auch wenn der metallische Kontakt zwischen Draht *10* und Zylinder *7* ungenügend ist, wird letzterer dennoch ausreichend über *10* aufgeladen. Kabel *13* ist mit dem Plus-, Kabel *14* mit dem Minuspol einer Gleichstrom-Hochspannungsquelle verbunden. *15* Zigaretten, *16* rauchen.

Wie oben bereits gesagt, wird ein großer Teil der Verunreinigungen im Eluat an das Aluminiumoxyd adsorbiert. Um die Einwirkung der nicht-adsorbierten Verunreinigungen auf die Atropinbestimmung festzustellen, wurde folgender Wiedergewinnungsversuch angestellt:

Zigaretten mit 0,20 g Tabak ohne Atropinzusatz wurden durch ein Cottrellfilter verraucht, welches daran anschließend mit 50 ml Chloroform ausgewaschen wurde. Zu dieser Lösung wurde eine bestimmte Quantität Atropin zugesetzt, und diese Mischung dann, wie oben beschrieben, behandelt. Es fanden sich in dieser $97 \pm 1{,}5\%$ der zugesetzten Atropinmenge wieder, was noch innerhalb der Fehlergrenze der Methode liegt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der chemischen Bestimmung des Atropingehaltes im Rauch von mit Atropin versetzten Zigaretten sind in Tab. 1 enthalten. Daraus geht hervor, daß bei Zigaretten, die 0,20 g Tabak enthalten und

Tabelle 1. *Atropingehalt im Rauch von mit Atropinsulfat versetzten Zigaretten mit 0,20 g „nicotinfreiem" (0,06% Tabak*

Atropinsulfat, zugesetzte Menge	Im Rauch wiedergewonnene Quantität Atropin, berechnet als Atropinsulfat	
in mg	in mg	in Prozent
5,0	1,19	23,8
	0,92	18,4
	1,11	22,2
	1,34	26,8
	1,32	26,4
	1,40	28,0
	1,14	22,8
	1,51	30,2
		M 25,1
10,0	2,48	24,8
	1,87	18,7
	2,96	29,6
	2,78	27,8
	2,95	29,5
	2,24	22,4
	2,71	27,1
	2,30	23,0
	2,59	25,9
	2,11	21,1
		M 25,0
20,0	4,96	24,8
	4,48	22,4
	5,00	25,0
	4,04	20,2
	5,30	26,5
	5,00	25,0
		M 24,0

mit 5—20 mg Atropinsulfat versetzt sind, im Durchschnitt etwa 25% davon in den Rauch übergehen.

Tab. 2 u. 3 enthalten die Ergebnisse der Alkaloidbestimmungen im Rauch von Asthmazigaretten, welche mit einem Wattefilter aus längsgehenden Baumwollfasern versehen waren. Etwa 7% des Alkaloidgehalts dieser Zigaretten gingen in den Rauch über. Bei den gleichen Zigaretten, aber ohne Filter geraucht, wurden 18% des Alkaloidgehaltes im Rauch

Tabelle 2. *Alkaloidgehalt (berechnet als Atropinsulfat) im Rauch von Asthmazigaretten mit Filtermundstück*

Alkaloidgehalt pro Zigarette, berechnet als Atropinsulfat mg	Im Rauch wiedergewonnene Quantität Atropin, berechnet als Atropinsulfat	
	in mg	in Prozent
4,06	0,24	5,9
	0,33	8,1
	0,25	6,2
	0,24	5,9
	0,38	9,4
		M 7,1

Tabelle 3. *Alkaloidgehalt (berechnet als Atropinsulfat) im Rauch von Asthmazigaretten ohne Filter*

Alkaloidgehalt pro Zigarette, berechnet als Atropinsulfat mg	Im Rauch wiedergewonnene Quantität Atropin, berechnet als Atropinsulfat	
	in mg	in Prozent
4,06	0,63	15,5
	0,86	21,2
	0,67	16,5
	0,73	18,0
	0,73	18,0
		M 17,8

wiedergefunden. Es ergibt sich also, daß etwa 60% des Gesamtalkaloidgehaltes im Rauch durch diese Art Filter absorbiert wird.

Tab. 4 gibt an, welche Atropinmenge im Organismus zurückbleibt. Hier ist zu bemerken, daß der Rauch auf zwei verschiedene Weisen inhaliert wurde, teils tief, teils nur oberflächlich. Tiefe Inhalation, bei der zudem der Rauch einige Sekunden in der Lunge zurückgehalten wurde, führte zu einer vollständigeren Aufnahme des inhalierten Ärosols (siehe auch Stalport 1945).

Die Haltbarkeit der Zigaretten wurde in der Weise untersucht, daß die Zigaretten 2 Jahre bei Zimmertemperatur aufbewahrt und danach analysiert wurden. Eine signifikative Abnahme der aus dem Rauch wiedergewonnenen Atropinsulfatmenge konnte nach dieser Lagerzeit nicht beobachtet werden (Tab. 5).

Tabelle 4. *Wiedergewinnung von Atropin aus der Ausatmungsluft bei verschiedener Rauchweise*

Abgabe von 1,45 mg Atropin pro Zigarette in den Hauptstrom des Rauches

Rauchweise	Versuchsperson	Wiedergewonnen in der Ausatmungsluft mg	Retention in Prozent
Oberflächliches Rauchen	O. E.	1,19	18
	O. W.	1,17	19
Tiefe Rauchinhalation mit Einhalten der Inspirationsstellung während jeweils mehrerer Sekunden	O. E.	0,23	84
	O. W.	0,33	77

Tabelle 5. *Atropingehalt im Rauch von mit Atropinsulfat versetzten Zigaretten mit 0,20 g „nicotinfreiem" Tabak*

Die verwandten Zigaretten hatten 2 Jahre gelagert

Atropinsulfat, zugesetzte Menge	Im Rauch wiedergewonnene Quantität Atropin, berechnet als Atropinsulfat	
in mg	in mg	in Prozent
10,0	2,35	23,5
	2,45	24,5
	1,90	19,0
	2,45	24,5

Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß unter bestimmten Bedingungen innerhalb gewisser Grenzen eine prozentual gleiche Menge Atropin in den Rauch von Zigaretten überführt wird. Beim Rauchen von Zigaretten, die auf eine Tabaksmenge von 0,20 g 5—20 mg Atropinsulfat enthalten, gehen etwa 25% des Atropins in den Rauch über.

Bei Stramoniumzigaretten ist der Alkaloidübergang in den Rauch etwas geringer. Als Erklärung dafür kann unter anderem angenommen werden, daß die Alkaloidmenge pro Gramm geringer war als bei den von uns hergestellten Atropinzigaretten. Ferner ist es denkbar, daß ungleiche Sublimationsbedingungen vorliegen, weil das Alkaloid einmal als natürlicher Zellinhalt, das andere Mal als künstlicher Zusatz vorkommt.

Mit Absicht wurde bei den Untersuchungen keine Rauchmaschine verwandt, welche konstante Rauchbedingungen geschaffen hätte. Bezüglich der Atropinzigaretten besteht nicht die Frage, daß diese gesellschaftsmäßig geraucht werden, sondern lediglich zu dem Zweck, dem Organismus so rasch wie möglich ein Pharmakon zuzuführen. Da das

Cottrellfilter naturgetreues Rauchen ermöglicht, konnten persönliche Variationen beim Rauchen in die Resultate einbezogen werden.

Aus der Literatur geht hervor, daß 15—30% des Nicotins in den Rauch übergehen (Wynder 1955, Koskowski 1955). Hierbei wird nur der Hauptstrom berücksichtigt, das ist der Rauch, welcher durch die Zigarette gesogen wird. Der Seitenstrom, das ist der Rauch, welcher zwischen den Inhalationen entsteht, tritt gewöhnlich nicht in die Atmungsorgane ein und hat daher nur geringes pharmakologisches Interesse.

Auch bezüglich anderer Stoffe als Nicotin wurden Analysen angestellt. So fand Wegner (1956), daß Oxychinolin, als konservierendes Mittel zugesetzt, zu etwa 30% in den Rauch überging. Es erscheint so, als ob viele der natürlich vorkommenden wie auch der künstlich zugesetzten Stoffe beim Zigarettenrauchen zu 20—30% in den Rauch übergehen. Ein großer anderer Teil wird dagegen während des Rauchens zerstört. Angesichts der hohen Temperaturen in der Verbrennungszone der Zigaretten von etwa 900° C (Touey u. Mumpower 1957) wird das verständlich. Der Zigarettenrauch hat, wenn er in den Mund eintritt, bereits eine Temperatur von weniger als 37° C und ist demnach einem kräftigen Temperaturabfall ausgesetzt. Dieser Temperaturabfall erfolgt außerordentlich rasch (Harlow 1956), mit etwa 600° C in 0,01 sec. Die Bedingungen für die Entstehung eines Ärosols nach dem Kondensationsprinzip sind also sehr günstig. Ärosole, die sich auf diese Weise gebildet haben, zeichnen sich durch eine geringe Partikelgröße und eine weitgehend homogene Partikelverteilung aus.

Die Partikelgröße bei einem inhalierten Ärosol ist von entscheidender Bedeutung bezüglich der Substanzmenge, welche in der Lunge zurückgehalten wird. Für das Eindringen in die Lungenalveolen ist ein Partikeldurchmesser von weniger als 1 μ erforderlich. Andererseits ist es für die Retention der Partikel in der Lunge günstiger, wenn der Partikeldurchmesser etwas größer ist (Altshuler, Yarmus, Palmes u. Nelson 1957). Von größtem Einfluß auf die retinierte Quantität ist jedoch die Inhalationsweise. Tiefe Rauchinhalation mit danach etwas angehaltener Inspirationsstellung führt zu einer wesentlichen Erhöhung der retinierten Quantität (Stalport 1945). Für das Nicotin ist dieses gut bekannt (Baumberger 1923), und Tab. 4 zeigt, daß es sich beim Atropin analog verhält. Praktisch kann eine ausreichend tiefe Rauchinhalation aus einer Atropinzigarette der Injektion dieses Stoffes gleichgestellt werden (Holmstedt u. Wallén 1958).

Atropin wurde früher mit einem Flüssigkeitsärosol zugeführt, sowohl bei Normalpersonen wie auch bei Asthmatikern (Dautrebande, Philippot, Charlier, Dumoulin u. Nogarède 1942). Es scheint, daß ein Effekt auf die Vitalkapazität bei Normalpersonen nicht besteht. Ein

durch ein Parasympathicomimeticum ausgelöster Bronchospasmus kann dagegen durch Atropin effektiv bekämpft werden (Beakey, Bresnick, Levinson u. Segal 1949). Auch bei Asthmatikern ist die Wirkung von Atropinärosolen untersucht worden, wobei unter anderem eine erhöhte Vitalkapazität sowie eine augenblickliche subjektive Besserung festgestellt wurde (Dautrebande u. Philippot 1941). In einigen Fällen scheint man mit Atropin auch dann einen günstigen Effekt zu bekommen, wenn Sympathicomimetica ohne Wirkung bleiben. Erst kürzlich wurde die Wirkung eines mit Atropinzigaretten bereiteten Atropinärosols von Herxheimer (1958) bei chronischem Bronchialasthma untersucht und auch dabei eine Zunahme der Vitalkapazität gefunden.

Das Verfahren, medizinisch-therapeutisch verwendbare Ärosole mit Hilfe von Zigaretten herzustellen, zeichnet sich durch besondere Einfachheit aus. Es gibt mehrere Apparate, mit denen eine Flüssigkeit in Ärosolform überführt werden kann. Diese sind in der Regel sehr umfangreich und bestehen aus Spray, Kondensationsgefäß für große Tropfen, einem Mundstück als Inhalationsteil und einem unter Druck stehenden Gas.

Aus den hier beschriebenen Untersuchungen geht hervor, daß durch das Rauchen von mit Atropin versetzten Zigaretten das Alkaloid in einer für praktische Zwecke ausreichenden Konzentration den Patienten zugeführt werden kann. Durch die Herstellung dieser Zigaretten aus nicotinfreiem Tabak erreicht man, daß diese leicht verträglich sind. Eine gewisse Gewöhnung an das Zigarettenrauchen ist jedoch erforderlich.

Summary

1. Cigarettes, containing 5—20 mg. of atropine sulphate and made of tobacco with a low content of nicotine, were smoked.

2. The smoke was collected with a Cottrell filter and dissolved in chloroform.

3. The atropine was purified by partition chromatography and estimated spectrophotometrically.

4. When cigarettes, containing 0,2 g. of tobacco and 5—20 mg. of atropine sulphate, were smoked, an average of 25% of the atropine was found in the smoke.

5. From asthma cigarettes that were made of stramonium leaves, a smaller amount of atropine, percentage wise, passed over in the smoke; this may be explained by the low content of alkaloids in the leaves.

6. Deep inhalations gave a retention in the lungs of approximately 80% of the atropine content in the smoke. When the cigarettes were smoked "superficially" the retention was only about 20%.

Diese Untersuchung ist durch Mittel des Schwedischen Medizinischen Forschungsrates ermöglicht worden. Für wertvollen technischen Beistand möchten die Verff. Laborator Torsten Wilner ihren großen Dank aussprechen.

Literatur

Altshuler, B., L. Yarmus, E. D. Palmes and N. Nelson: Arch. ind. Health **15**, 293 (1957).
Baumberger, J. P.: J. Pharmacol. exp. Ther. **21**, 35 (1923).
Beakey, J. F., E. Bresnick, L. Levinson and M. S. Segal: Ann. Allergy **7**, 113 (1949).
Bouaziz, A.: Thesis, Toulose 1954.
Dautrebande, L. E., et F. Philippot: Arch. int. Pharmacodyn. **66**, 138 (1941).
Dautrebande, L. E., E. Philippot, R. Charlier, E. Dumoulin et F. Nogarède: Arch. int. Pharmacodyn. **68**, 117 (1942).
Dautrebande, L. E.: Physiol. Rev. **32**, 214 (1952).
Finnegan, J. K.: Bull. nat. Formulary Comm. **18**, 131 (1950).
Günther, G.: Wien. klin. Wschr. **24**, 748 (1911).
Harlow, E. S.: Science **123**, 226 (1956).
Herxheimer, H.: Persönliche Mitteilung 1958.
Hirn, R.: Zschr. des allgem. Österr. Apothekerver. S. 1454, 1903.
Holmstedt, B., u. O. Wallén: 1958 (im Druck).
Koskowski, W.: The Habit of Tobacco Smoking. London: Staples Press, Ltd. 1955.
Schill, G., u. A. Ågren: Svensk. farm. T. **55**, 781 (1951).
Stalport, J.: Arch. int. Pharmacodyn. **71**, 248 (1945).
Terp, P.: Acta pharmacol. **4**, 135 (1948).
Touey, G. P., and R. C. Mumpower: Tobacco Science **1**, 33 (1957).
Tönnesen, M.: Acta pharmacol. **4**, 186 (1948).
Wegner, E.: Arzneimittel-Forsch. **6**, 299 (1956).
Wilner, T.: Svensk. kem. Tidskr. **63**, 141 (1951).
Wynder, E. L.: The Biologic Effects of Tobacco. Boston: Little, Brown & Co. 1955.

Dozent Dr. B. Holmstedt, Farmakologiska institutionen, Karolinska Institutet Stockholm 60/Schweden

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 352—363 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Farbenfabriken Bayer A. G.,
Werk Wuppertal-Elberfeld

Zur Wirkung System-insecticider Phosphorsäure-Ester im Warmblüter-Stoffwechsel*

Von
WOLFGANG WIRTH

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Mai 1958)

Das von SCHRADER (1948) entwickelte System-Insecticid „Systox" liegt in 2 isomeren Formen vor, der Thiono-Verbindung = Diäthylthiophosphorsäure-Ester von Äthylthioglykol und der Thiol-Verbindung („Iso-Systox") = Diäthylphosphorsäure-Ester von Äthyldithioglykol (Tab. 1). Über die ersten toxikologisch-pharmakologischen Untersuchungen dieses interessanten Produktes am Warmblüter hat WIRTH (1953) berichtet. In gleicher Weise, wie das von uns in der „E 605"-Gruppe festgestellt worden war, zeigte sich auch bei „Systox" die Thiol-Verbindung pharmakologisch wesentlich aktiver als die Thiono-Verbindung. Dies drückte sich u. a. in der Warmblüter-Toxicität und im Grad der Hemmung des Fermentes Acetyl-Cholinesterase aus. Es war uns hierbei bereits aufgefallen, daß wäßrige Lösungen von Thiono-„Systox" beim Stehen an Wirksamkeit auf die Cholinesterase und an Toxicität zunehmen. Wir vermuteten eine Umlagerungsreaktion. Den Beweis hierfür erbrachten HENGLEIN u. SCHRADER (1955), die zeigten, daß in wäßrigen Lösungen eine Umlagerung der energiereicheren Thiono-Verbindung in die energieärmere Thiol-Verbindung statthat, auf die Wasser und überhaupt polare Lösungsmittel beschleunigend, nichtpolare Lösungsmittel, z. B. Tetrachlorkohlenstoff, hemmend wirken. Weitere Umwandlungen der Verbindungen sind von METCALF u. Mitarb. (1954/55) festgestellt worden: In der Pflanze unterliegen beide „Systox"-Isomere Oxydationsprozessen am Thioäther-Schwefel, so daß sich Sulfoxyde mit 4wertigem und Sulfone mit 6wertigem Schwefel bilden, die an der Dauer der „Systox"-Wirkung beteiligt sind. METCALF u. Mitarb. (1955) haben an Mäusen gezeigt, daß solche Umwandlungen auch im Warmblüter-Organismus erfolgen können. Als hauptsächliches Organ für diesen

* Nach einem Vortrag auf dem IV. Internationalen Pflanzenschutz-Kongreß am 12. 9. 1957 in Hamburg. — Herrn Prof. Dr. Dr. W. SCHULEMANN zum 70. Geburtstag gewidmet.

oxydativen Stoffwechsel wird hierbei die Leber angesehen, im Insekt (amerikanische Schabe) vorzugsweise Darm, Muskel und Nervengewebe.

Die „Systox" Oxydationsprodukte waren von SCHRADER u. Mitarb. zum Zwecke der biologischen Prüfung bereits früher (1951/52)[1] synthetisiert worden.

Im Hinblick auf die erhebliche Toxicität von „Systox" haben Präparate geringerer Warmblüter-Giftigkeit bei sonst gleichem Wirkungsprinzip besondere Bedeutung. Unter diesem Gesichtspunkt ist von SCHRADER (1950) auch der entsprechende Dimethyl-Ester[2] synthetisiert worden, der nach Untersuchungen im Institut von W. SCHULEMANN durch KLIMMER u. PFAFF (1955) wesentlich weniger toxisch ist als die entsprechende Äthyl-Verbindung.

Wie bei „Systox" spielen auch bei Methyl-„Systox" die Oxydationsprodukte am Thioäther-Schwefel für das Zustandekommen der insecticiden Wirkung in der Pflanze eine wesentliche Rolle, wie Versuche von MÜHLMANN u. TIETZ (1956) ergaben.

Interessant sind auch die Befunde von HEATH u. VANDEKAR, die eine intramolekulare Alkylierungsreaktion beschrieben, welche bei längerem Stehen wäßriger Methyl-„Systox"-Lösungen zu einer Sulfonium-Verbindung führt.

Vor kurzem ist von SCHRADER (1955)[3] ein weiteres wichtiges Insecticid aus der Systox-Reihe entwickelt worden, der Thiono-Thiolphosphorsäure-Ester „Disyston" (Tab. 1). Dieses Produkt ist interessant, weil es in gleicher Weise wie das in USA bekannt gewordene „Thimet[4]" die Saatgutbeizung in eine neue Richtung leitet: Die Präparate werden in Aktivkohle-Mischung aus 50% Wirkstoff und 50% Kohle zur Behandlung von Samen verwendet. Hierbei nehmen die Samen soviel vom Wirkstoff auf, daß sie mehrere Wochen gegen saugende Insekten immun sind. Etwa 13 Wochen nach dem Aufgehen des Samens sind diese Stoffe nach den Angaben der Entomologen und Pflanzenschutzphysiologen wieder eliminiert.

Auch bei diesen neuen Stoffen kommt es nach METCALF, FUKUTO u. MARCH (1957) in der Pflanze zur Oxydation am Thioäther-Schwefel.

Es ist jedoch nicht mit Sicherheit erwiesen, ob bei der Intoxikation des Warmblüters mit „Systox", Methyl-„Systox" oder mit „Disyston" und „Thimet" die entsprechenden Oxydationsprodukte entscheidend ins

[1] DBP. 876691 v. 6. 7. 1951 W. LORENZ; DBP. 876692 v. 7. 7. 1951 G. SCHRADER u. W. LORENZ; DBP. 871448 v. 31. 7. 1951 W. LORENZ.

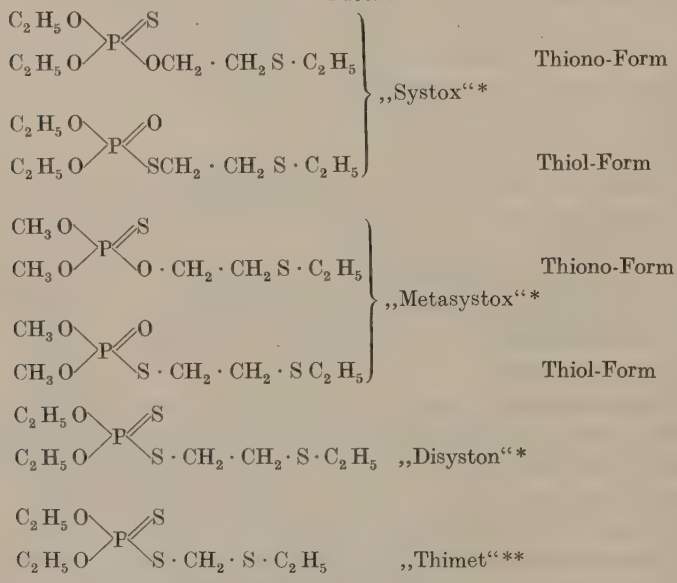
[2] Der Methyl-Ester ist inzwischen in einem festen Verhältnis der Thiono- und Thiol-Form unter der Bezeichnung „Meta-Systox" in den Pflanzenschutz eingeführt worden.

[3] DAS. 10101960 v. 13. 10. 1955 G. SCHRADER.

[4] Erstmals synthetisiert von G. SCHRADER u. W. LORENZ, vgl. DBP. 917668 v. 2. 8. 1952.

Gewicht fallen. Im Zusammenhang mit Arbeiten zur Abklärung dieser Frage soll hier zunächst über gewisse pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften dieser Stoffe und ihrer Oxydationsprodukte, die uns von Dr. Schrader zur Verfügung gestellt wurden, berichtet werden. Aus diesen Eigenschaften lassen sich unseres Erachtens bereits Rückschlüsse auf ihr Verhalten im Warmblüter-Organismus ziehen.

Tabelle 1



* EWz Farbenfabriken Bayer.
** EWz American Cyanamid Co/USA.

Versuchsanordnung

Im wesentlichen haben wir uns auf die Untersuchung der Beeinflussung der Cholinesterase[1]-Aktivität von Rattenhirn und Menschenblut (in vitro-) und von Rattenblut (in vivo-Versuche) beschränkt, zugleich mit Toxicitäts-Bestimmungen. Wir gehen hierbei von der wohl heute allgemein anerkannten Annahme aus, daß der Beeinträchtigung des Fermentes ChE bei der Warmblüter-Wirkung der insecticiden Phosphorsäure-Ester ein maßgeblicher Einfluß zuzumessen ist. Dies gilt zumindest für die akuten Wirkungen, deren Zusammenhang mit dieser Fermentblockierung durch die unabhängig voneinander geführten Untersuchungen von Adrian, Feldberg und Kilby, von E. Gross und von Gremels und Wirth (1) aufgedeckt worden ist.

In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich akute Wirkungen wiedergegeben. Hierbei erachten wir es für zulässig, aus einem Vergleich von in vitro- mit in vivo-Wirkungen auf das Ferment Rückschlüsse auf sekundäre Vorgänge, insbesondere Umwandlungen der Substanzen im Organismus zu ziehen.

[1] Im folgenden abgekürzt: ChE.

Die ChE-Aktivität wurde im Warburg-Apparat nach der manometrischen Methode von Ammon bestimmt; die näheren Bedingungen vgl. bei Wirth (2).

Für die in vitro-Versuche am Rattenhirn benützten wir ein gefriergetrocknetes Präparat aus den Hirnen von mehreren erwachsenen männlichen Tieren. Im Eisschrank aufbewahrt, lieferte es uns im Kontrollversuch über viele Monate völlig konstante Werte. Das Menschenblut stammte von gesunden freiwilligen männlichen Blutspendern.

Die in vivo-Versuche wurden an männlichen Ratten im Gewicht von 150 bis 250 g durchgeführt, die am Abend vorher vom Futter abgesetzt waren, aber Trinkwasser ad libitum erhielten. 2 Std nach der oralen Einverleibung der P-Esterdosis wurde den Tieren in leichter Äther-Narkose Aortenblut entnommen und sogleich durch schonendes Rühren defibriniert. Nach der Blutentnahme wurden die Tiere getötet. Wie Vorversuche ergaben, liegt bei unserer Versuchsanordnung etwa 2 Std nach der Verabreichung der P-Ester das Maximum der ChE-Hemmung.

Die Angaben über die DL_{50} an Ratten beziehen sich auf eine Nachbeobachtungszeit von 4 Tagen.

Die Wasserlöslichkeit der meisten hier untersuchten Stoffe ist sehr gering, wir haben sie daher in Lösung (höchstens 0,5%ige Emulsion) mit Hilfe des Emulgators 233 (polyoxäthyliertes Phenol) gebracht. Der Emulgator ist ohne Einfluß auf die Toxicität; er ist auch für die Anwendung in den Warburg-Versuchen geeignet.

Unsere Versuchsergebnisse sind in den nachfolgenden Tab. 2—4 und Abb. 1—2 zusammengestellt.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die *in vitro-Versuche* geben uns einen Hinweis für den Grad der Affinität der einzelnen Verbindungen zu den betreffenden Cholinesterasen. In der „Systox"- und Methyl-„Systox"-Reihe (I—XII) ist die Affinität der Thiol-Verbindungen (IV—VI) und (X—XII) in jedem Fall wesentlich größer als diejenige der Thiono-Verbindungen (I—III und VII—IX). Die stärkste Ferment-Affinität haben die *nicht* am Äther-Schwefel oxydierten Stoffe Thiol-„Systox" (IV) und Thiol-Methyl-„Systox" (X). Die davon abgeleiteten Sulfoxyde (V, XI) und Sulfone VI, XII) sind bedeutend weniger aktiv. In der Thiono-Reihe gilt sinngemäß das gleiche, besonders hinsichtlich der Sulfone (III, IX), die mehr als eine Größenordnung schwächer als die entsprechenden nicht-oxydierten Thiono-Verbindungen sind. Das Sulfoxyd von Thiono-Methyl-„Systox" (VIII) ist ebenfalls wesentlich weniger aktiv als die nicht-oxydierte Verbindung (VII), während sich bei „Systox" die Thiono-Verbindung (I) nur wenig stärker als das Sulfoxyd (II) erwies.

Im Gegensatz zu dieser recht deutlichen Differenzierung der Sulfoxyde und Sulfone untereinander und gegenüber den entsprechenden nicht-oxydierten Verbindungen in vitro, zeigen die Ergebnisse der *in vivo-Experimente* eine bemerkenswerte Gleichförmigkeit. Hier liegen die Werte für Toxicität bzw. ChE-Hemmung innerhalb der Stoffgruppen Thiono-„Systox" (I—III), Thiol-„Systox" (IV—VI) und Thiol-Methyl-„Systox" (X—XII) jeweils in der gleichen Größenordnung. Lediglich die Gruppe Thiono-Methyl-„Systox" (VII—IX) fällt durch ein stärker

Tabelle 2. *„Systox" und Oxydationsprodukte*
Toxicität und Wirkung auf die Cholinesterase-Aktivität

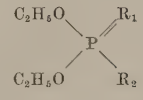
			50%ige Hemmung der Cholinesterase-Aktivität											Toxicität
			in vitro-Versuche									in vivo (per os)			
			Hirn (Ratte)			Serum (Mensch)			Erythrocyten (Mensch)			Erythrocyten (Ratte)			Ratte per os DL 50 mg/kg
				molar			molar			molar			molar		
	R_1	R_2	$\frac{\gamma}{ml}$	10^{-6}	bezogen auf (IV) = 1	$\frac{\gamma}{ml}$	10^{-6}	bezogen auf (IV) = 1	$\frac{\gamma}{ml}$	10^{-6}	bezogen auf (IV) = 1	$\frac{\gamma}{g\ Tier}$	$\frac{\mu\ mol}{g}$	bezogen auf (IV) = 1	
(I)	=S	$-OCH_2 \cdot CH_2 \cdot S \cdot C_2H_5$	1,1	4,26	55	0,49	1,9	25	1,2	4,65	15	3,6	14	8	30
(II)	=S	$-OCH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{O}{\overset{\|}{S}} \cdot C_2H_5$	1,3	4,75	60	0,84	3,1	40	1,7	6,2	20	2,6	9,5	6	100
(III)	=S	$-OCH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{O\ O}{\overset{\diagdown\diagup}{S}} \cdot C_2H_5$	14	48,3	620	5	17,2	220	14,8	51	160	5,8	20	12	90
(IV)	=O	$-SCH_2 \cdot CH_2 \cdot S \cdot C_2H_5$	0,02	0,078	1	0,02	0,078	1	0,08	0,31	1	0,43	1,67	1	1,5
(V)	=O	$-SCH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{O}{\overset{\|}{S}} \cdot C_2H_5$	0,98	3,58	45	0,41	1,5	20	0,7	2,56	8	0,45	1,65	1	2,0
(VI)	=O	$-SCH_2 \cdot CH_2 \cdot \overset{O\ O}{\overset{\diagdown\diagup}{S}} \cdot C_2H_5$	0,83	2,86	35	0,15	0,52	7	0,49	1,69	5	0,4	1,38	0,83	2,0

Tabelle 3. *Methyl-„Systox“ und Oxydationsprodukte*
Toxicität und Wirkung auf die Cholinesterase-Aktivität

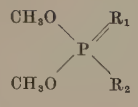
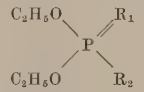
			50%ige Hemmung der Cholinesterase-Aktivität											Toxicität
			in vitro-Versuche									in vivo (per os)			
			Hirn (Ratte)			Serum (Mensch)			Erythrocyten (Mensch)			Erythrocyten (Ratte)			
				molar			molar			molar			molar		Ratte per os DL 50 mg/kg
	R_1	R_2	$\frac{\gamma}{ml}$	10^{-6}	bezogen auf $(X) = 1$	$\frac{\gamma}{ml}$	10^{-6}	bezogen auf $(X) = 1$	$\frac{\gamma}{ml}$	10^{-6}	bezogen auf $(X) = 1$	$\frac{\gamma}{g\ Tier}$	$\frac{\mu\ mol}{g}$	bezogen auf $(X) = 1$	
(VII)	=S	—O·CH_2·CH_2·S·C_2H_5	~1	~4	~3	unsicher			unsicher			9	39,1	10	250
(VIII)	=S	—O·CH_2·CH_2·S(=O)·C_2H_5	1,5	6,1	4	4,2	17,1	10	9,4	38,2	16	115	470	120	600
(IX)	=S	—O·CH_2·CH_2·S(=O)(=O)·C_2H_5	8,2	31,3	20	3,1	11,8	7	11,0	42	18	36	140	36	500
(X)	=O	—S·CH_2·CH_2·S·C_2H_5	0,33	1,44	1	0,38	1,65	1	0,55	2,4	1	0,9	3,9	1	60
(XI)	=O	—S·CH_2·CH_2·S(=O)·C_2H_5	1,4	5,69	4	6,7	27,2	17	2,9	11,8	5	1,8	7,3	2	30
(XII)	=O	—S·CH_2·CH_2·S(=O)(=O)·C_2H_5	3,0	11,5	8	11,3	43	26	6,3	24,0	10	1,4	5,3	1,4	40

Tabelle 4. *„Disyston“, „Thimet“ und Oxydationsprodukte*
Toxicität und Wirkung auf die Cholinesterase-Aktivität

			50%ige Hemmung der Cholinesterase-Aktivität								Toxicität
			in vitro-Versuche						in vivo (per os)		
			Hirn (Ratte)			Erythrocyten (Mensch)			Erythrocyten (Ratte)		
			$\frac{\gamma}{ml}$	molar 10^{-6}	molar bezogen auf $(XIX) = 1$	$\frac{\gamma}{ml}$	molar 10^{-6}	molar bezogen auf $(XIX) = 1$	$\frac{\gamma}{g\ Tier}$	molar $\frac{\mu mol}{g}$	molar bezogen auf $(XIX) = 1$	Ratte per os DL 50 mg/kg
	R_1	R_2										
(XIII)	=S	—S·CH_2·CH_2·S·C_2H_5 „Disyston“	bei 1 mg/ml 30% Hemmung		> 1600	bei 900 γ/ml 26% Hemmung		> 900	0,85	3,1	5	5
(XIV)	=S	—S·CH_2·CH_2·S(=O)·C_2H_5	bei 1 mg/ml 25% Hemmung		> 1600	bei 900 γ/ml 20% Hemmung		> 900	1,1	3,78	6	6,5
(XV)	=S	—S·CH_2·CH_2·S(=O)(=O)·C_2H_5	bei 1 mg/ml keine Hemmung		> 1600	bei 900 γ/ml 15% Hemmung		> 900	0,96	3,14	5	7,5
(XVI)	=S	—S·CH_2·S·C_2H_5 „Thimet“	bei 100 γ/ml 14% Hemmung		> 190	bei 100 γ/ml 40% Hemmung		> 100	0,7	2,69	4	2,1
(XVII)	=S	—S·CH_2·S(=O)·C_2H_5	143	520	260	48	174	53	0,55	1,99	3	2,1

(XVIII)	=S	$-S \cdot CH_2 \cdot S \cdot C_2H_5$ (O, O)	6	20,6	10	9	30,8	9	0,53	1,82	3		1,7
(XIX)	=O	$-S \cdot CH_2 \cdot S \cdot C_2H_5$ (O, O)	0,48	2	1	0,8	3,3	1	0,15	0,61	1		0,25
(XX)	=O	$-S \cdot CH_2 \cdot S \cdot C_2H_5$ (O, =O)	0,065	0,25	0,12	0,21	0,81	0,25	0,21	0,81	1,3		1,0
(XXI)	=O	$-S \cdot CH_2 \cdot S \cdot C_2H_5$ (O, O)	0,1	0,36	0,18	0,24	0,87	0,24	0,25	0,91	1,5		0,5

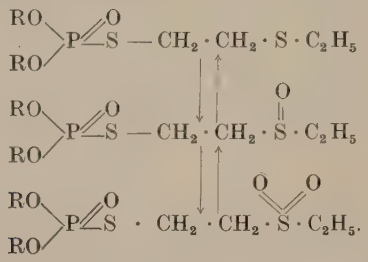
auseinandergezogenes Feld auf. Die Stoffe der Thiol-„Systox"-Gruppe (IV—VI) hatte auch Dubois in der Hand; er war zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Die Zusammengehörigkeit der Vertreter jeweils einer Stoffgruppe kommt auch deutlich in Abb. 1 zum Ausdruck, in der die Dosis-Wirkungskurven für die in vivo-Versuche aufgezeichnet sind.

Es ist also festzustellen, daß in der „Systox"- und Methyl-„Systox"-Reihe die Sulfoxyde und Sulfone *in vitro* nur einen Bruchteil der Hemmwirkung der entsprechenden nicht-oxydierten Verbindungen besitzen. *In vivo* sind dagegen diese Unterschiede nicht mehr vorhanden. Dies spricht dafür, daß in vivo Umwandlungen in den einzelnen Stoffgruppen vorliegen.

An den eingangs erwähnten Ergebnissen von Metcalf über die oxydativen Eingriffe in das Systox-Molekül auch im Warmblüter-Organismus ist nicht zu zweifeln. Andererseits ist aus der Biologie hinreichend bekannt, daß im Organismus reversible Reaktionen vor allem zum Stoffaufbau in erheblichem Umfang stattfinden. Ich möchte daher aus meinen Versuchen folgern, daß es sich bei unseren Stoffen um reversible Reaktionen handelt, um Redox-Reaktionen, die also auch einen Übergang aus der höheren Oxydations-Stufe in die niedrigere ermöglichen, z. B. vom Sulfon (VI) und Sulfoxyd (V) zur

Thiol-Verbindung (IV). Diese Umstände scheinen mir besonders bei den Thiol-Verbindungen vorzuliegen.

Die Reaktionsgleichungen, die Metcalf für den Übergang der nicht-oxydierten in die oxydierten Verbindungen aufgestellt hat, wären demnach durch Gleichgewichts-Gleichungen zu ersetzen, deren Gleichgewichts-Konstanten in biologischen Medien noch zu bestimmen sind:



Bei Einverleibung eines Stoffes aus der „Systox"- oder Methyl-„Systox"-Gruppe ist demnach mit großer Wahrscheinlichkeit mit einer *kombinierten Stoffwirkung* zu rechnen. Also nach Zufuhr z. B. von (IV) oder von (V) oder von (VI) wirken (IV) + (V) + (VI) zusammen, wobei der Anteil der einzelnen Komponenten sich aus der Lage des Gleichgewichts im Sinne obiger Gleichungen ergibt.

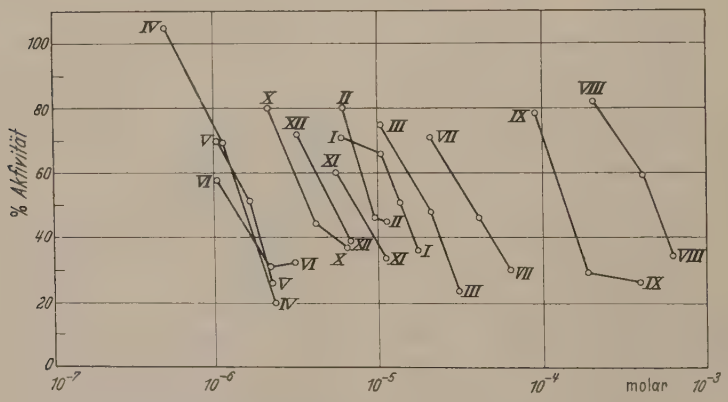


Abb. 1. Versuche in vivo an Ratten per os. Einfluß der Stoffe *I—XII* auf die Cholinesterase-Aktivität der Erythrocyten (2 Std nach Zufuhr)

In diese Betrachtungen sind natürlich auch die Umlagerungsreaktionen der Thiono- zu Thiol-Verbindungen einzubeziehen, auf die in der Einleitung bereits hingewiesen wurde. Es folgt hieraus, daß z. B. bei Einverleibung von (I) tatsächlich mit einer kombinierten Wirkung der Stoffe (I)—(VI) zu rechnen ist.

In der Reihe der Thiono-Thiolphosphorsäure-Ester ergaben sich zum Teil wesentlich andere Befunde.

„Disyston" (XIII) und das entsprechende Sulfoxyd (XIV) und Sulfon (XV) zeigten in vitro keine nennenswerte Hemmwirkung. Im in vivo-Versuch war sie dagegen mehr als 1000mal stärker, auch die Toxicität erwies sich sehr erheblich, vgl. Tab. 4. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, liegen die Dosis-Wirkungskurven auch in der „Disyston"-Gruppe relativ eng zusammen. Es ist wohl unzweifelhaft, daß bei Einverleibung von „Disyston", des Sulfoxyd oder des Sulfon keine dieser Substanzen als der eigentliche Wirkstoff anzusehen ist. Man kann mit gutem Grund die wirksamen Stoffwechselprodukte in der Thiol-„Systox"-Reihe (IV—VI) suchen, zu denen die „Disyston"-Stoffe durch Oxydation am Phosphor umgewandelt werden. Hierfür sprechen chemische Gründe — die leichte Oxydierbarkeit der „Disyston"-Stoffe in vitro zu

$$>P\overset{\overset{O}{\parallel}}{-}S\text{-Verbindungen}$$[1].

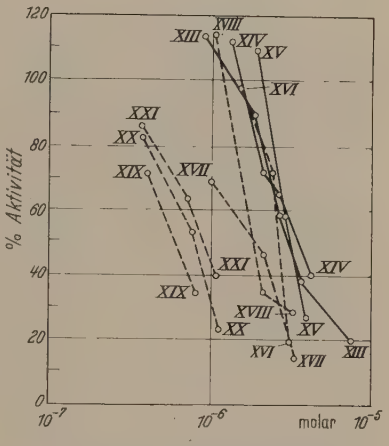


Abb. 2. Versuche in vivo an Ratten per os. Einfluß der Stoffe *XIII—XXI* auf die Cholinesterase-Aktivität der Erythrocyten (2 Std nach Zufuhr)

In der „Thimet"-Gruppe ist „Thimet" selbst (XVI) in vitro ohne besondere Wirkung auf die ChE. Sie steigt bei den am Thioäther-Schwefel oxydierten Produkten erheblich an, wobei sich das Sulfon (XVIII) wesentlich stärker aktiv als das Sulfoxyd (XVII) erwies. Wir haben also in dieser Gruppe umgekehrte Verhältnisse wie in der „Systox"- und Methyl-„Systox"-Gruppe, in denen die nicht-oxydierten Verbindungen in vitro am stärksten waren. Auch in der „Thimet"-Thiol-Gruppe (XIX—XXI) sind die am Thioäther-Schwefel oxydierten Stoffe in vitro aktiver als die nicht-oxydierten.

Bei den Versuchen in vivo liegen dagegen innerhalb jeder Stoffgruppe (XVI—XVII und XIX—XXI) in gleicher Weise einheitliche Ergebnisse vor, wie wir dies in der Reihe des „Systox", Methyl-„Systox" und „Disyston" bereits feststellten, vgl. Abb. 2. Diese Einheitlichkeit kommt auch hinsichtlich der Toxicität bei oraler Gabe zum Ausdruck.

Die erheblichen Differenzen in der Wirkung in vitro gegenüber in vivo bei der „Thimet"-Gruppe (XVI—XVIII) macht es auch hier

[1] Vgl. DBP. 1009621 v. 12. 3. 1956 W. Lorenz u. G. Schrader.

wahrscheinlich, daß die stark aktiven Thiol-Verbindungen (XIX—XXI) die im Stoffwechsel entstehenden Wirksubstanzen sind. Zwischen Thiol-„Thimet" (XIX), dem Sulfoxyd (XX) und Sulfon (XXI) sind in ähnlicher Weise wie bei „Systox" und Methyl-„Systox" reversible Oxydations- und Reduktionsgleichgewichte anzunehmen. Die Einverleibung von „Thimet" führt also ebenso wie bei „Systox", Methyl-„Systox" und „Disyston" zu einem Kombinationseffekt mehrerer Wirksubstanzen.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, inwieweit bei den system-insecticiden Phosphorsäure-Estern „Systox", Methyl-„Systox", „Disyston" und „Thimet" die Warmblüter-Wirkung mit einer Oxydation am Thioäther-Schwefel im Stoffwechsel zusammenhängt. Zu diesem Zwecke wurde die Cholinesterase-Hemmwirkung der Stoffe und ihrer Oxydationsprodukte in vitro an Rattenhirn, an Erythrocyten und Serum vom Menschen und weiterhin in vivo an Erythrocyten von Ratten geprüft. Zugleich wurde auch die Rattentoxicität bei oraler Zufuhr bestimmt.

Die Affinität der Äther-Schwefel-Oxydationsprodukte (Sulfoxyd, Sulfon) zu den angewandten Cholinesterase-Fermenten erwies sich in den in vitro-Versuchen mit den Stoffen der „Systox"- und Methyl-„Systox"-Gruppe wesentlich schwächer als diejenige der nicht-oxydierten Verbindungen. In vivo lagen — mit Ausnahme der Thiono-Methyl-„Systox"-Gruppe — innerhalb jeder Stoffgruppe die Werte für Toxicität und für die Cholinesterase-Hemmung jeweils in der gleichen Größenordnung. Dies gilt auch für die „Disyston"- und „Thimet"-Reihe. Aus unseren Versuchen folgern wir, daß bei „Systox" und Methyl-„Systox" im Organismus zwischen der nicht-oxydierten Form und ihren entsprechenden Oxydationsprodukten (Sulfoxyd und Sulfon) ein Gleichgewichtszustand besteht. Die Warmblüter-Toxicität der beiden Stoffgruppen „Systox" und Methyl-„Systox" ist daher nicht allein auf die Äther-Schwefel-Oxydationsprodukte zu beziehen, sondern auch auf die nicht-oxydierten Stoffe. Da bei den Thiono-Verbindungen auch eine Umlagerung zur Thiol-Form in Betracht kommt, handelt es sich bei der Wirkung von „Systox"- und Methyl-„Systox" am Warmblüter demnach um kombinierte Effekte mehrerer Stoffwechselprodukte.

Bei der „Disyston"- und „Thimet"-Gruppe ist anzunehmen, daß im Warmblüterorganismus eine Umwandlung zu Oxydationsprodukten am Phosphor stattfindet. Auch hier ist mit der gleichzeitigen Wirkung mehrerer Stoffwechsel-Produkte zu rechnen.

Bei der Durchführung der vorliegenden Versuche wurde ich von meinem Laboranten, Herrn Günter Mertins, unterstützt, wofür ich ihm vielmals danke.

Literatur

Adrian, E. D., W. Feldberg, and B. A. Kilby: Brit. J. Pharmacol. **2**, 56 (1947).
Ammon, R.: Methoden der Fermentforschung **2**, 1585 (1941).
Dubois, K. P., S. D. Murphy and D. R. Thursh: A. M. A. Arch. of Ind. Hyg. **13**, 606 (1956).
Heath, D. F., and M. Vandekar: Biochem. J. **67**, 187 (1957); vgl. auch Nature (Lond.) **179**, 377 (1957).
Henglein, A., u. G. Schrader: Z. f. Naturforsch. **10** b, 12 (1955).
Klimmer, O. R., u. W. Pfaff: Arzneimittel-Forsch. **5**, 584 (1955).
Metcalf, R. L., R. B. March, T. R. Fukuto and M. A. Maxon: J. Econ. Entomol. **47**, 1045 (1954); **48**, 347, 355, 364 (1955).
Metcalf, R. L., T. R. Fukuto and R. B. March: J. Econ. Entomol. **50**, 338 (1957).
Mühlmann, R., u. H. Tietz: Höfchen-Briefe (Bayer) 1956, Nr. 2, 116.
Schrader, G.: (1) Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen, Monographie Nr. 62. 2. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie 1952. — (2) Angew. Chem. **69**, 86 (1957).
Wirth, W.: (1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **207**, 547 (1949). — (2) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **217**, 144 (1953). — (3) Dtsch. med. Wschr. **1954**, 1205.

Prof. Dr. med. et phil. W. Wirth, Pharmakologisches Institut der Farbenfabriken Bayer A.G., Werk Wuppertal-Elberfeld

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. ,Bd. 234, S. 364—372 (1958)

Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Chirurgischen Klinik der Universität München

Über Hemmkörper für Trypsin und Kallikrein im Blut der Weinbergschnecke (Helix pomatia) und über eine Kreislauf-Schockwirkung des Schneckenblutes

Von

E. Werle, W. Appel und E. Happ

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Mai 1958)

Einleitung

Im Verlauf unserer Arbeiten über natürlich vorkommende Hemmkörper für Proteinasen und für Kallikrein (Werle u. Appel; Werle, Maier u. Ringelmann; Werle, Forell u. Maier; Werle u. Maier) prüften wir auch Blut von Kaltblütern und fanden bei der Weinbergschnecke (Helix pomatia) eine sehr bemerkenswerte Inhibitorwirkung gegenüber Trypsin und Kallikrein. Bei der Messung der Kallikrein inaktivierenden Wirkung des Schneckenblutes fiel uns auf, daß schon verhältnismäßig geringe Mengen des Schneckenblutes beim Hund i.v. injiziert einen tödlichen Kreislaufschock auslösen können. Die nähere Untersuchung dieser Tatsachen führte zu den nachfolgend geschilderten Ergebnissen.

Methodik

1. Gewinnung des Schneckenblutes. Das Schneckenhaus wird mittels eines leichten Hammers über dem Herzen geöffnet. Das pulsierende Herz wird mit einer Injektionskanüle punktiert und die Schnecke so gehalten, daß das Blut in ein Reagensglas abtropfen kann. Man erhält so 1—3 ml Blut pro Tier. Nach dem Entbluten werden die Schnecken in siedendem Wasser getötet. Es wurden etwa 200 Tiere an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Standorten entblutet. Das Blut ist leicht milchig und hell-blaß-blau und gerinnt nicht; beim Stehen an der Luft wird der Blauton intensiver (Hämocyanin).

Das Schneckenvollblut ergibt bei der horizontalen Papierelektrophorese (Elphor H, 220 V, 6 Std in Veronal/Veronal-Na p_H 8,6) nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B nur *eine* gefärbte Zone, deren Lage sich mit der α_2-Globulinfraktion des Menschenserums deckt.

2. Nachweis und Bestimmung der Inhibitorwirkung. *a) Hemmung von Trypsin.* Die Bestimmung der Hemmfähigkeit des Schneckenblutes gegenüber Trypsin erfolgt unter Verwendung der etwas modifizierten Proteolyse-Meßmethode von Anson u. Mirsky mit Harnstoff-denaturiertem Rinderhämoglobin als Substrat.

Fermentlösung. 5,0 mg Trypsin („Worthington", 2mal kristallisiert, salzfrei) in 5,0 ml Wasser lösen; aufbewahren bei 0°C. Pro Ansatz werden 100 μg Trypsin (= 0,1 ml Lösung) eingesetzt.

Substrat. 2,20 g Trockenhämoglobin vom Rind („Behringwerke" Marburg) werden in 82 ml dest. Wasser gelöst, 36,0 g Harnstoff und 8,0 ml 1,0n NaOH zugegeben und gut umgerührt. Die Lösung wird im Wasserbad auf 25° C erwärmt und 30—60 min stehen gelassen; dann werden 10,0 ml 1,0m KH_2PO_4 und 4,0 g Harnstoff zugegeben. Das Substrat ist bei 4° C ein bis zwei Tage haltbar.

Durchführung. Inhibitorlösung und Wasser (Inhibitor + dest. Wasser ad 1,0 ml) bzw. im Leeransatz 1,0 ml Wasser allein werden in einem 25 ml Erlenmeyer-Kölbchen auf 38,5° C erwärmt. Die Vorinkubation beginnt zur Zeit 0 mit 100 μg Trypsin. Nach 10 min werden 5,0 ml Substrat zugegeben, dieses genau 10 min (im Leeransatz 0 min) einwirken lassen, dann mit 10,0 ml 0,3m Trichloressigsäure versetzt und nach weiteren 10 min filtriert. (Filter Nr. 587 E mit 7 cm ⌀ der Fa. Schl. & Sch.) 5,0 ml des Filtrats versetzt man mit 10,0 ml 0,5n NaOH und 3,0 ml Phenol-Reagens nach Folin-Ciocalteu (der Fa. Bayer, Leverkusen; 1 : 3 mit aqua dest. vor jeder Messung verdünnt). Nach 2—10 min wird die entstandene blaue Farbe am Beckman-Spektrophotometer bei 6600 Å gegen dest. Wasser gemessen. Die Hemmung wird in Prozent der Aktivität des Trypsin-Leeransatzes ausgedrückt.

b) Inaktivierung von Kallikrein. Die Bestimmung des nicht inaktivierten Kallikreins erfolgt am Carotis-Blutdruck des narkotisierten Hundes.

Abnehmende Volumina von frischem Schneckenblut werden zu Kallikreinlösungen bekannten Gehaltes gegeben, mit 0,15m Na_2HPO_4-KH_2PO_4-Puffer p_H 7,2 auf das gleiche Endvolumen gebracht, die Ansätze im Brutschrank 1 Std bei 37° C inkubiert und die nicht inaktivierte Kallikreinmenge am Blutdruck des Hundes ausgetestet. Diejenige Menge Schneckenblut, die unter den angegebenen Bedingungen 1 Kallikrein-Einheit (1 KE) zu 50% zu inaktivieren vermag, enthält dann gerade 1 Kallikrein-Inaktivator-Einheit (1 KIE) (H. Kraut u. E. Werle).

Ergebnisse

1. Nachweis und Bestimmung eines Hemmkörpers für Trypsin. *a) Konzentration des Schneckenblutes und Trypsin-Hemmungsgrad.* Unter den angegebenen Standardbedingungen wurde der Hemmungsgrad von 100 μg Trypsin nach Zusatz steigender Mengen Schneckenblut bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben. Danach wird die Wirkung von 100 μg Trypsin durch 0,0008 ml Blut (entsprechend einer Menge von etwa 15 μg organischer Substanz) zu 50% gehemmt; 0,0001 ml hemmen noch zu 5—10%. Damit erreicht die Inhibitorwirkung des unveränderten Schneckenblutes die Wirkung von bekannten, kristallisierten Trypsin-Inhibitoren (M. Laskowsky). Die Hemmwirkung nimmt zunächst mit steigender Blutmenge bis zu einem Maximum zu, sinkt dann deutlich ab, erreicht weiter ein zweites, etwas niedrigeres Maximum, um dann auf 0 abzusinken. Der zweigipflige Verlauf der Hemmkurve ließ vermuten, daß das Schneckenblut zwei verschiedene Inhibitoren für Trypsin enthält, was die weiteren Untersuchungen bestätigten. Bei allen untersuchten Blutproben liegen die beiden Hemm-Maxima genau an der gleichen Stelle. Das Verhältnis der Konzentrationen der beiden Inhibitoren ist demnach konstant. Abb. 1 stellt die Resultante aus Messungen mit 6 verschiedenen Sammelblutproben von Weinbergschnecken dar.

b) Vorinkubationszeit und Trypsin-Hemmungsgrad. Die Abhängigkeit des Ausmaßes der Trypsin-Hemmung bei gegebener Blutmenge von der Dauer

der Vorinkubation wurde bei Zimmertemperatur und bei 38° C untersucht. Die Vorinkubationszeit lag zwischen 0 und 120 min bei 38° und zwischen 10 u. 240 min bei 22° C. Aus der Abb. 2 ist zu ersehen, daß die Hemm-

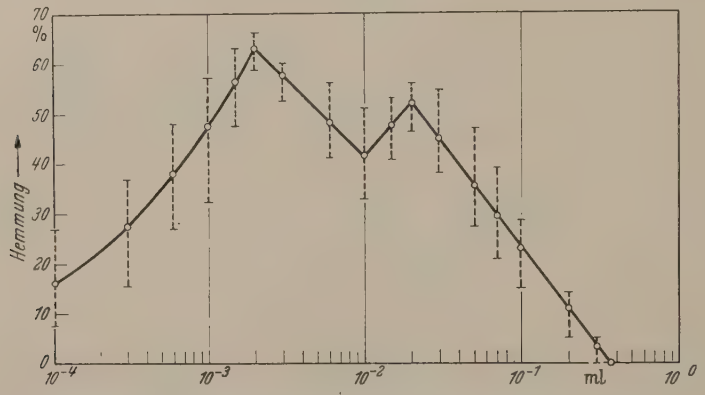


Abb. 1. Hemmung von 100 μg Trypsin durch steigende Mengen Schneckenblut bei 38° C

wirkung des Schneckenblutes mit der Vorinkubationszeit zunimmt. Die Bildung des Trypsin-Trypsinhemmkörper-Komplexes erfordert also eine gewisse Zeit, ist demnach nicht einer reinen Ionenreaktion gleichzusetzen.

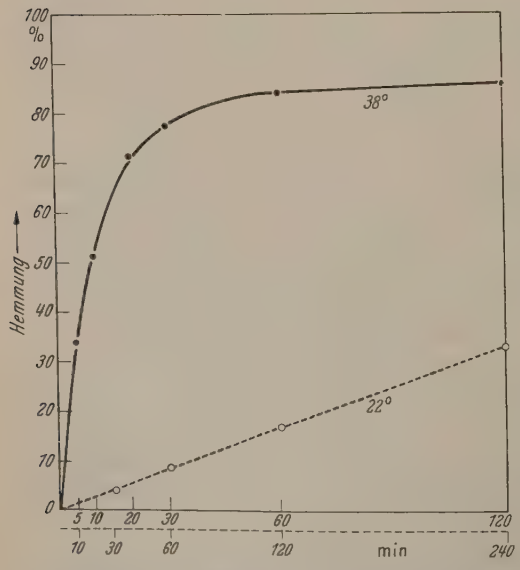


Abb. 2. Vorinkubationszeit und Stärke der Trypsinhemmung (Ansatz: 100 μg Trypsin + 0,0015 ml Blut von Helix pomatia. Versuchstemperatur: 38° u. 22° C)

c) Vorinkubationstemperatur und Trypsin-Hemmungsgrad. Die Hemmfähigkeit einer gegebenen Blutmenge ist bei Zimmertemperatur sehr gering, nimmt aber mit steigender Vorinkubationstemperatur stark zu. Die Bildung des Trypsin-Inhibitorkomplexes wird also durch Temperaturerhöhung begünstigt (Abb. 3).

d) Salzkonzentration bei der Vorinkubation und Trypsin-Hemmungsgrad. Durch Zusatz von $5 \cdot 10^{-2}$ m Lösung von NaH_2PO_4 — KH_2PO_4 (p_H 7,2) NaCl, KCl, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $CoCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, Na_2SO_4, CH_3COONa oder

$NaHCO_3$ zum Schneckenblut während der Vorinkubation wird dessen Hemmfähigkeit für Trypsin aufgehoben. Salzlösungen mit einer Konzentration unter 10^{-4} m beeinflussen die Hemmfähigkeit des Schneckenblutes für Trypsin nicht mehr (Abb. 4). Setzt man während der Vorinkubation, z. B. nach 10 min, eine konzentrierte Salzlösung zu, so bleibt der zu diesem Zeitpunkt erreichte Hemmwert auch bei weiterer Inkubation bestehen. Werden die zugesetzten Salze durch Dialyse des Vorinkubats gegen fließendes Wasser wieder entfernt, so wird auch die Hemmfähigkeit des Blutes wieder hergestellt. Dies gilt für beide Maxima der Hemmkurve.

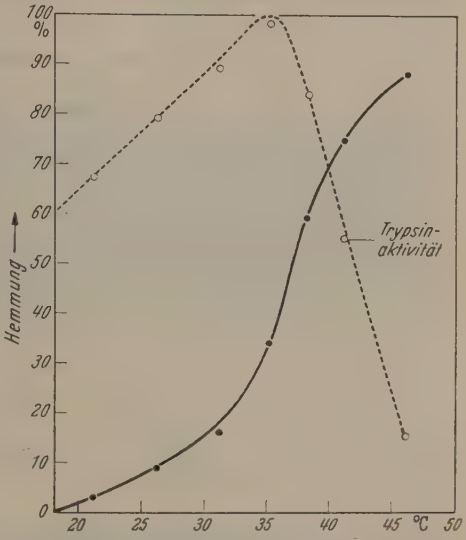


Abb. 3. Temperatur bei der Vorinkubation und Stärke der Trypsinhemmung (•——•). (Ansatz: 100 µg Trypsin + 0,0015 ml Blut von Helix pomatia). Trypsinaktivität und Vorinkubationstemperatur (○- - - ○)

e) Unterscheidung eines hoch- und eines niedermolekularen Trypsinhemmkörpers. Wird das Schneckenblut 72 Std gegen stehendes Wasser dialysiert, so weist das eingeengte Außendialysat eine Hemmfähigkeit

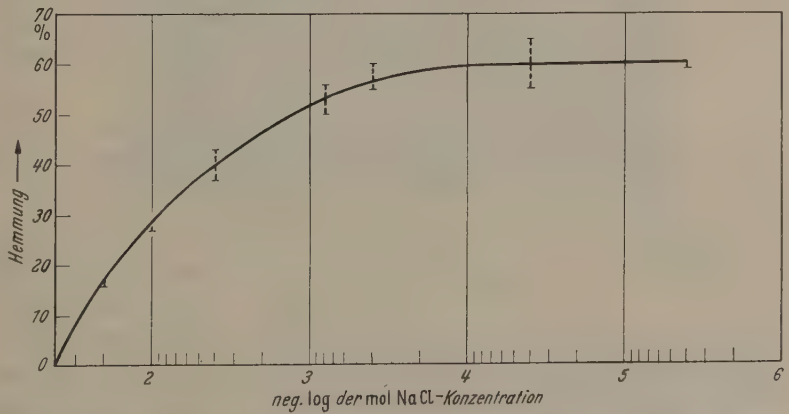


Abb. 4. Salzkonzentration bei der Vorinkubation und Trypsinhemmung (Ansatz: 100 µg Trypsin + 0,003 ml Blut von Helix pomatia)

gegenüber Trypsin auf, die mit steigenden Mengen Außendialysat zunimmt. Die Hemmfähigkeit des Innendialysats ist nur unwesentlich abgeschwächt; der darin enthaltene hochmolekulare Hemmkörper ist

thermolabil und salzempfindlich. Mit steigenden Mengen Innendialysat nimmt die Hemmfähigkeit bis zu einem Maximum zu und fällt — bei noch höheren Konzentrationen — dann rasch auf 0 ab, während beim eingeengten Außendialysat überoptimale Mengen die Hemmwirkung nicht abschwächen. Die Wirkung des hochmolekularen Hemmkörpers entspricht dem ersten Maximum, die des niedermolekularen dem zweiten Maximum der Hemmkurven (Abszisse: fallende Blutmengen siehe Abb. 5).

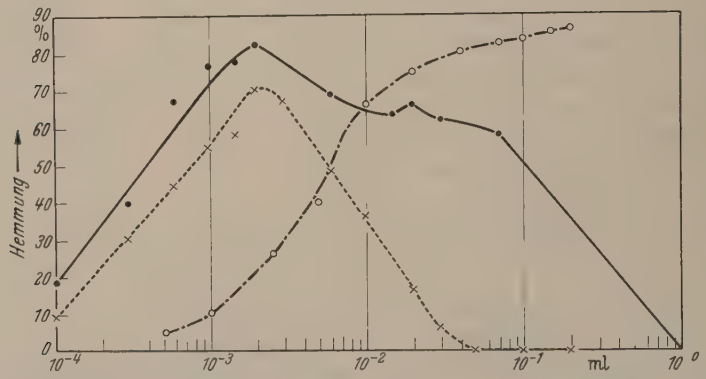


Abb. 5. Trennung des hochmolekularen vom niedermolekularen Trypsininaktivator. •—• Hemmkapazität des unveränderten Schneckenblutes. ×----× Hemmkapazität des Innendialysates. ○-—-—○ Hemmkapazität des Außendialysates

Der niedermolekulare Hemmkörper ist kochbeständig, jedoch wie der hochmolekulare salz- empfindlich. Durch monatelanges Aufbewahren bei — 15° C nimmt die Hemmfähigkeit für Trypsin über den gesamten Konzentrationsbereich des Schneckenblutes nicht ab.

f) Zur Wirkungsspezifität des Trypsin-Inhibitors. Mit der gleichen Technik wie bei Trypsin wurde auf Hemmwirkung des Schneckenblutes gegenüber kristallisiertem Chymotrypsin und hochgereinigtem Papain geprüft: Beide Fermente werden nicht gehemmt.

2. Nachweis und Bestimmung eines Inaktivators für Kallikrein. Der Gehalt des Schneckenblutes an Kallikrein-Inaktivator schwankt zwischen 2,5 und 15 KIE/ml Vollblut. Damit liegt der KIE-Gehalt größenordnungsmäßig im gleichen Bereich wie bei Seren anderer Kalt- und aller Warmblüter, einschließlich des Menschen. Die Inaktivierung ist reversibel: durch Zugabe von 0,1 n HCl zu einem völlig inaktiven Ansatz wird ein Teil des Kallikreins wieder in Freiheit gesetzt und am Carotisblutdruck nachweisbar. Das Schneckenblut enthält also einen reversibel wirkenden Inaktivator für Kallikrein. Beim Aufbewahren des Schneckenblutes bei + 4° und — 15° C verschwindet die Inaktivierungsfähigkeit

für Kallikrein innerhalb weniger Tage. Abb. 6 zeigt die Wirkung von Kallikrein vor und nach Inaktivierung durch Schneckenblut.

3. Erzeugung von Kreislaufschock durch Schneckenblut. Intravenöse Gaben von Schneckenblut führen beim künstlich beatmeten, mit Pernocton narkotisierten Hund zu einem verzögert einsetzenden, steilen Blutdruckabfall, der nach etwa 3—10 min zum Tode führen kann

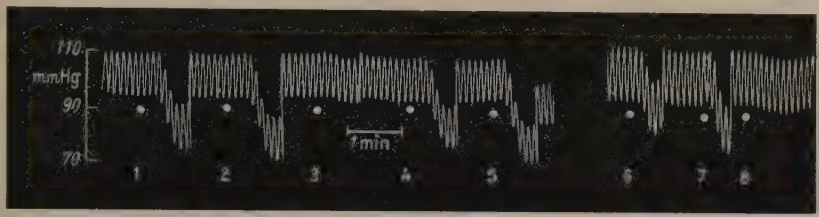


Abb. 6. *Inaktivierung von Kallikrein durch Schneckenblut.* Hund ♂ 16 kg (Kurventeil *1—5*) bzw. 29 kg. (Kurventeil *6—8*) Morphium-Pernocton-Narkose. Künstliche Atmung; Carotisdruckschreibung Ludwigsches Hg-Manometer. Ansätze: I. 1 ml (a) und 0,2 ml (b) unverändertes frisches Schneckenblut + je 1 E Kallikrein aus Schweinepankreas + Aqua dest. ad 2 ml; 1 Std 37°. II. 0,5 (a) und 2 ml (b) Schneckenblut + je 5 E Kallikrein aus Rinder-Submandibularis + Aqua dest. ad 2,5 ml; 1 Std 37°. I.v. Injektionen bei *1* 0,25 KE-Pankreas *2* und *5* je 0,35 KE-Pankreas *3* u. *4* die 0,35 KE entsprechende Menge Ansatz a und *b; 6* 0,6 KE-Submandibularis; *7* die 1,2 KE entsprechende Menge Ansatz IIa; *8* die 1,2 KE entsprechende Menge Ansatz II b. Die Kurven lassen erkennen, daß Pankreas- und Submaxillariskallikrein durch Schneckenblut inaktivierbar sind

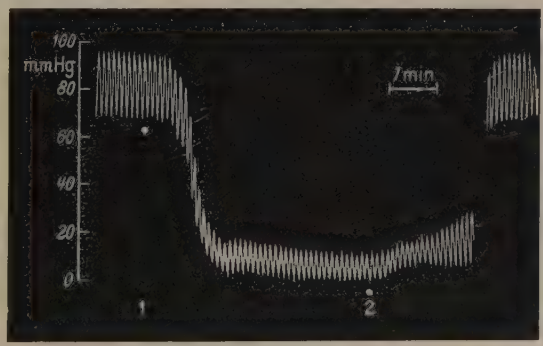


Abb. 7. *Auslösung von Kreislaufschock beim narkotisierten Hund durch i.v. Injektion von Schneckenblut.* Hund ♀ 19 kg; Pernocton-Morphium-Narkose; künstlich beatmet. Bei *1* i.v. Injektion von 0,5 ml Schneckenblut; *2* 0,15 ml Peripherin i.v. Die Blutdruckkurve ist aus Gründen der Platzersparnis nicht vollständig wiedergegeben

(Abb. 7). Die letalen Dosen liegen zwischen 0,06 und 0,12 ml/kg Körpergewicht. Injiziert man nach dem Druckabfall sofort gefäßtonisierende Substanzen, wie Arterenol[1] oder Peripherin[2], so läßt sich der letale Ausgang verhindern und der Blutdruck wieder normalisieren. Bei Verabreichung geringerer Blutmengen fällt der Blutdruck weniger stark ab und kehrt anschließend langsam zum Ausgangswert zurück.

[1] Farbwerke Hoechst.
[2] Chemiewerk Homburg.

Nach einer einmaligen, stark wirksamen Dosis von Schneckenblut spricht das Versuchstier auf ein Vielfaches der bei einer Erstinjektion erfahrungsgemäß letalen Dosis nicht mehr oder sehr viel schwächer an, auch wenn bis zur Zweitinjektion bis zu 8 Std verstrichen sind.

Die Schock-auslösende Wirkung des Schneckenblutes nimmt bei mehrwöchigem Lagern bei —15° C, bei einstündigem Erhitzen auf 56° C oder bei 72stündiger Dialyse in Cellophan gegen fließendes Wasser nicht ab. Die Schock-auslösende Substanz ist hochmolekular; kurzes Aufkochen des Blutes zerstört sie.

Die Ursache der Schockwirkung ist noch unbekannt; es ist zwar nicht ausgeschlossen, daß sie in einer Histaminfreisetzung besteht, doch lag nach orientierenden Versuchen zur Zeit des niedersten Blutdrucks der Histaminspiegel des Blutes der Versuchshunde (bestimmt nach A. H. Mohamed u. O. Zaki) nicht über 0,01 μg/ml Blut. Ferner vermochte Schneckenblut das Histamin gewaschener Erythrocyten von Kaninchen nicht freizusetzen. In Anlehnung an Versuche von Valette u. Huidobro über die Histamin freisetzende Wirkung von Haaren der Prozessionsraupe wurde 1,0 ml Erythrocyten-Suspension mit 0,05—1,0 ml Schneckenblut versetzt; Kontrollansätze enthielten statt des Blutes gleiche Volumina physiologischer NaCl-Lösung oder eine Lösung des Histaminlockers 48/80 (0,1 bis 0,6 mg). Nach einstündiger Inkubation wurden die Erythrocyten abzentrifugiert und das Histamin in der überstehenden Lösung am isolierten Meerschweinchendarm bestimmt. In den Ansätzen mit Schneckenblut war der Histamingehalt nur ebenso hoch wie in den Ansätzen mit NaCl, dagegen stark erhöht in den Ansätzen mit 48/80.

Auch aus den Mastzellen des Mesenteriums von Meerschweinchen wurde durch Schneckenblut kein Histamin freigesetzt (histologische Kontrolle nach der Methode von Schauer u. Werle). Agglutination der Hundeerythrocyten wird durch das Schneckenblut nicht bewirkt. Zur Bildung von Bradykinin aus Hundeserum ist das Schneckenblut nicht befähigt.

Anders als beim Hund löst die intravenöse bzw. intracardiale Injektion von Schneckenblut bei Meerschweinchen und Ratten keinen Schock aus. Es wurden dabei bis zu 1,0 ml Blut von den Tieren reaktionslos vertragen.

Die Schockwirkung dürfte nach diesen Befunden nicht auf Histaminfreisetzung zurückzuführen sein.

Diskussion

Bemerkenswert ist die außerordentlich hohe Wirksamkeit des Trypsin-hemmenden Prinzips des Schneckenblutes: Die in 0,8 μl Schneckenblut enthaltene Trockensubstanzmenge von rund 15 μg vermag 100 μg Trypsin zu 50% zu hemmen. Dieses Verhältnis wird größenordnungsmäßig auch bei anderen, natürlich vorkommenden, aber bis zur Kristallisation angereicherten Trypsin-Inhibitoren beobachtet. Es ist anzunehmen, daß der noch nicht in Substanz isolierte Trypsin-Inhibitor des Schneckenblutes die Inhibitorwirkung des aktivsten, kristallisierten Trypsin-Inhibitors, nämlich des Schweine-Colostrum-Inhibitors von Laskowsky, Kassell u. Hagerty erreicht oder sogar übertrifft.

Das Hämocyanin von Helix pomatia zeigt beim isoelektrischen Punkt ein Molekulargewicht von 6740000; es zerfällt jedoch bei p_H-Änderung in Bruchstücke, die nacheinander die Hälfte, ein Achtel oder ein Sechzehntel der Größe des ursprünglichen Proteins darstellen. Nimmt man ein gleiches Verhalten des — primär hochmolekularen — Trypsin-Inhibitors an, so würde durch Verdünnen des Blutes die Dissoziation der Inhibitormoleküle verstärkt, durch Zugabe von Salzen in höherer Konzentration zurückgedrängt. Die aktiven Zentren des hochmolekularen Schneckenblut-Inhibitors, die die Enzymaktivität blockieren, sind — wenn die gemachte Annahme richtig ist — im Nativblut zum größten Teil maskiert und werden durch zunehmende Dissoziation freigelegt. Damit würde sich die zunächst erstaunliche Feststellung, daß beim Einsatz geringerer Blutmengen (d. h. infolge zunehmender Dissoziation im stets konstanten Volumen des Vorinkubationsansatzes) größere Hemmwerte gefunden werden, zwanglos erklären. Die Bildung der Trypsin-Hemmkörperkomplexe ist eine Zeitreaktion, somit nicht ionogener Natur. Dies gilt auch für die Bildung des Komplexes mit dem Trypsin-Hemmkörper des Schneckenblutes und für die Bildung der Kallikrein-Kallikrein-Inaktivator-Verbindung (siehe dazu die Übersicht über Trypsin-Inhibitoren und Hemmungsmechanismus der Trypsin- und Kallikrein-Inaktivierung von W. Appel).

Bei dem Schock-auslösenden Prinzip des Schneckenblutes dürfte es sich um ein Eiweiß handeln; es ist nach den bisherigen Feststellungen wahrscheinlich verschieden vom Trypsin-Inhibitor, sicher verschieden vom Kallikrein-Inaktivator. Eine Histaminausschüttung scheint nach den vorliegenden Beobachtungen bei der Entstehung des Kreislaufschocks nach Schneckenblutverabreichung keine Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die kristallisierten Trypsin-Inhibitoren aus Sojabohnen und Pankreas beim Hund nicht schockauslösend wirken.

Zusammenfassung

1. Das Blut der Weinbergschnecke (Helix pomatia) besitzt eine außerordentlich hohe Inhibitorwirkung für Trypsin. Die Aktivität von Chymotrypsin und Papain wird nicht beeinflußt.

2. Die Hemmwirkung des Blutes gegenüber Trypsin nimmt mit der Temperatur und der Vorinkubationszeit zu. Sie wird durch Zusatz von Salzen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-2}$ molar reversibel aufgehoben. Dieser Salzeffekt ist unabhängig von der Art des Kations (Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, Na^{+}, K^{+}, NH_4^{+} u. a.); er nimmt mit sinkender Salzkonzentration ab und ist bei 10^{-4} molaren Lösungen gleich Null, d. h. die Hemmwirkung einer gegebenen Menge Schneckenblut bleibt in einer 10^{-4} molaren Salzlösung voll erhalten.

3. Bei fallender Blut- und gleichbleibender Trypsinmenge nimmt der Hemmungsgrad zuerst bis zu einem Maximum ($2 \cdot 10^{-2}$ ml Blut) zu, sinkt dann deutlich ab, steigt zu einem zweiten, etwas niedrigeren Maximum an ($2 \cdot 10^{-3}$ ml) und sinkt dann auf 0 ab (unter 10^{-4} ml).

4. Das Schneckenblut enthält einen hoch- und einen niedermolekularen Hemmstoff für Trypsin. Bei überoptimaler Konzentration des hochmolekularen Inhibitors sinkt seine Hemmwirkung für Trypsin auf Null ab; bei dem niedermolekularen Hemmkörper bleibt sie dagegen erhalten. Der hochmolekulare Hemmkörper ist bei tiefer Temperatur im unveränderten Schneckenblut über Monate haltbar; er wird durch Kochen zerstört. Der niedermolekulare Hemmkörper ist kochbeständig; seine Hemmwirkung ist wie die des hochmolekularen salzempfindlich.

5. Das Blut der Weinbergschnecke enthält einen reversibel wirkenden Inaktivator für Kallikrein. Er ist im Blut wenig haltbar und nicht identisch mit den Trypsin-Inhibitoren.

6. Das Blut der Weinbergschnecke löst i.v. injiziert bei Hunden, nicht aber bei Ratten oder Meerschweinchen, einen schweren Kreislaufschock aus. Der Histamingehalt des Hundeblutes ist im Schockzustand nicht erhöht. Das schockverursachende Agens ist im eingefrorenen Schneckenblut monatelang haltbar, durch Kochen wird es zerstört.

7. Zur Bildung von Bradykinin aus Hundeserum ist das Schneckenblut nicht befähigt.

Literatur

Anson, M. L., u. A. Mirsky: J. gen. Physiol. **22**, 79 (1939).
Appel, W.: Inaugural-Dissertation, TH. München 1957.
Kraut, H., u. E. Werle: In Festschrift für E. K. Frey, Thieme Stuttgart 1958.
Laskowsky, M.: in Methodes in Enzymology II, 36 (1955).
Laskowsky, M., B. Kassell and G. Hagerty: Biochim. biophys. Acta **24**, 300 (1957).
Mohamed, A. H., and O. Zaki: Amer. J. Physiol. **190**, 113 (1957).
Schauer, A., u. E. Werle: Z. ges. exp. Med. (im Druck).
Valette, G., u. H. Huidobro: Arch. int. Pharmacodyn. **109**, 344 (1957).
Werle, E., u. W. Appel: Naturwissenschaften **45**, 60 (1958).
Werle, E., L. Maier u. R. Ringelmann: Naturwissenschaften **39**, 414 (1952).
Werle, E., M. M. Forell u. L. Maier: Naturwissenschaften **41**, 89 (1952).
Werle, E., u. L. Maier: Biochem. Z. **322**, 414 (1952).

Prof. Dr. Dr. E. Werle, Wissenschaftliches Laboratorium der Chirurgischen Klinik der Universität München 15, Nußbaumstr. 20

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 373—377 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zagreb
(Vorstand: Prof. Dr. I. Ivančević)

Die Wirkung des Ferro-Ions auf die glatte Muskulatur in situ*

Von
Z. Supek, S. Milković und B. Uroić

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Mai 1958)

Straub u. Stefansson haben gezeigt, daß die Adrenalinwirkung auf den Blutdruck durch Ferrosalzlösungen aufgehoben wird. Später haben Hermann u. Mitarb. festgestellt, daß Ferrosalzlösungen die Vasoconstriction zweier anderer vasoconstrictorischer Amine (Noradrenalin, Aminoäthansulfat) hemmen können. Dieselben Autoren haben gezeigt, daß dieser Antagonismus auch gegen Acetylcholin und Histamin besteht. Milković u. Mitarb. konnten eine Hemmung des vasopressorischen und vasodepressorischen Effekts des 5-Hydroxytryptamins (Serotonin) durch Dauerinfusion von Ferrosalzlösungen feststellen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Frage der Spezifität der Wirkung des Ferro-Ions auf die glatte Muskulatur behandelt. Zu dem Zwecke wird der Einfluß des Ferro-Ions auf die glatte Muskulatur der Gefäße, der Bronchien, des Uterus, des Dünndarmes, der Harnblase und der Nickhaut in situ untersucht.

Methodik

Als Versuchstiere dienten Hunde, Katzen und Kaninchen. Die Hunde und Katzen wurden mit Chloralose (0,07 g/kg) und die Kaninchen mit Urethan (1,25 g/kg) narkotisiert. Der Carotisblutdruck wurde mit dem Quecksilbermanometer gemessen. Die Versuchsanordnung für die Registrierung der Tätigkeit der Organe in situ war folgende: Bronchien nach Konzett u. Rössler; Dünndarm, Uterus und Harnblase nach Takashi Toyoma. Die Nickhautkontraktionen wurden in der üblichen Weise registriert. Die Reizung der vegetativen Nerven erfolgte mit Quadratimpulsen eines elektronischen Stimulators. Der Splanchnicus wurde in der Thorakalhöhle isoliert. Die verwendeten Substanzen waren: Adrenalin hydrochlorid, Noradrenalin hydrochlorid, Tonephin „Bayer" (5 iE/ml), Nicotin tartrat, Lobelin hydrochlorid, Angiotonin[1] (1 mg = 2 Edman-E), Ergotamin tartrat, Barium chlorid p. a., Acetylcholin hydrochlorid, Histamin dihydrochlorid, Pentamethonium bromid „Welcome". Alle Werte sind auf Salze berechnet. Die Ferrosalzlösungen (Ferrosulfat pro analysi) wurden langsam i. v. injiziert. Die Konzentration war immer 1,35 mg Fe^{++}/kg Körpergewicht. Wenn nicht anders angeführt, betrug die Geschwindigkeit der Injektion 1 ml/min.

* Vorläufige Mitteilung: XX. Int. Physiol. Kongr., Bruxelles, 1956, Abstr. S. 865.

[1] Freundlicherweise überlassen von Dr. I. H. Page, Cleveland, Ohio, USA.

Ergebnisse

Aus der Tab. 1 ist ersichtlich, daß alle untersuchten vasoaktiven Substanzen sich mit Ferro-Ionen hemmen lassen (+). Eine Ausnahme davon bilden Nicotin, Lobelin und Pentamethonium (—). Das Ferro-Ion zeigt keinen Antagonismus gegenüber diesen drei vasoaktiven Substanzen.

Tabelle 1. *Die Hemmung der vasculären Effekte durch Ferro-Ion*

Vasoconstrictoren				*Vasodilatatoren*	
Adrenalin	+	Tonephin	+	Acetylcholin	+
Noradrenalin	+	Angiotonin	+	Histamin	+
Sympatol	+	Barium chlorid	+	Pentamethonium	—
Ephedrin	+	Nicotin	—		
Aminoäthansulfat	+	Lobelin	—	*Elektrische Nervenreizung*	
Serotonin	+	Acetylcholin (nach Atropin und Eserin)	—	Splanchnicus	—
Ergotamin	+			Vagus	—

Mechanische Reizung der Pressoreceptoren

Sinus caroticus reflex —

Tabelle 2

Die Hemmung der Kontraktionen der glattmuskeligen Organe in situ durch Ferro-Ion

Spasmogen	Bronchien	Nickhaut	Uterus	Dünndarm	Harnblase
Adrenalin		+	+		
Serotonin	+	+			+
Histamin	+				
Acetylcholin				+	
Die Reizung des Halssympathicus . . .		—			

In Vorversuchen konnten wir keinen Antagonismus zwischen Ferro-Ion und Acetylcholin sowie Histamin zeigen. Später hat sich herausgestellt, daß hypotensive Effekte von Acetylcholin und Histamin sich auch mit dem Ferro-Ion verhindern lassen. Es scheint aber, daß diese Hemmung schwerer zu erzielen ist. Der vasopressorische Effekt des Acetylcholins nach Atropinisation und Eserinisation des Versuchstieres kann mit Ferro-Ionen nicht aufgehoben werden. Nur eine kleine Verminderung des Effekts konnte festgestellt werden. Die hypotensive Wirkung der elektrischen Reizung des Halsvagus bleibt während einer Dauerinfusion von Ferrosalzlösungen völlig unverändert. Die durch den Splanchnicus hervorgerufene Vasoconstriction ist mit Ferro-Ionen nur teilweise zu inhibieren. Diese Hemmung ist nach ipsolateraler Adrenalektomie nicht mehr vorhanden. Die reflektorische Blutdruckerhöhung nach Abklemmung beider Karotiden wird durch Ferro-Ionen nicht ausgelöscht.

Aus der Tab. 2 geht hervor, daß auch viele andere glattmuskelige Strukturen mit dem Ferro-Ion gehemmt werden. Die bronchoconstrictorische Wirkung des Histamins ist nach Injektion von Ferrosulfatlösung vollkommen aufgehoben. Die Reaktivität der Muskulatur ist

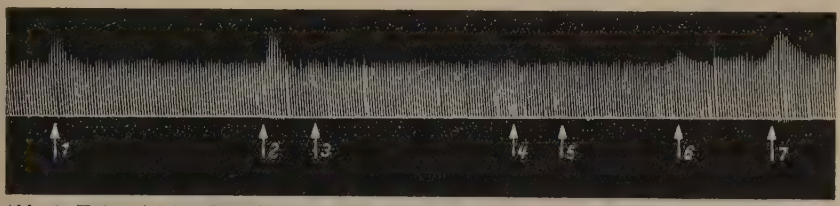


Abb. 1. Katze, 2,9 kg, Bronchien nach KONZETT u. RÖSSLER. *1* und *2* Histamin dihydrochlorid 5 μg i.v. *3* Langsame intravenöse Ferrosulfatinjektion beginnt. *4* wie *1*. *5* Ferrosulfatinjektion unterbrochen. *6* wie *1*. *7* wie *1* Geschwindigkeit 6 mm/min

nach 1 Std wieder vorhanden (Abb. 1). Dasselbe gilt auch für 5-Hydroxytryptamin (Serotonin). Die Kontraktionen des Uterus (Abb. 2), der Harnblase (Abb. 3) und des Dünndarmes, ausgelöst durch spasmogene Substanzen, lassen sich ebenfalls mit Ferrosalzlösung inhibieren. Durch Adrenalin und Serotonin verursachte Kontraktion der Nickhaut der Katze werden mit Ferro-Ionen aufgehoben, während durch Sympathicusreizung ausgelöste Kontraktionen unverändert bleiben.

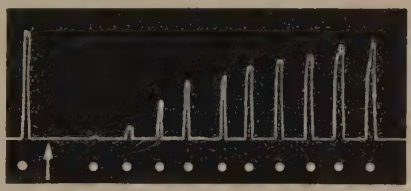


Abb. 2. Uterus des Kaninchens (3,4 kg) in situ. Beim Pfeil intravenöse Ferrosulfatinjektion (4 ml/3 min). Punkte: Adrenalin hydrochlorid 20 μg i.v. Geschwindigkeit 6 mm/min

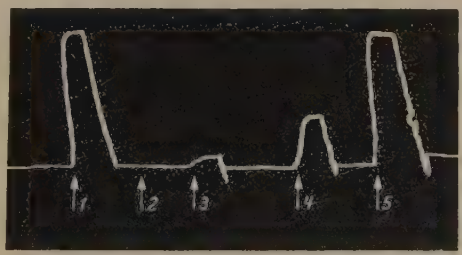


Abb. 3. Harnblase des Kaninchens (2,5 kg) in situ. *1* Serotonin-kreatinin-sulfat 100 μg i.v. *2* Intravenöse Ferrosulfatinjektion 6 ml/3 min. *3*, *4* und *5* wie *1* Geschwindigkeit 6 mm/min

Besprechung

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß durch Ferrosalzlösung die Gefäßwirkung vieler ganz verschiedener vasoaktiver Substanzen gehemmt wird. Nicht gehemmt werden: Nicotin, Lobelin und Pentamethonium. Die Dosen für Nicotin und Lobelin, die wir gebraucht haben, können als kleine betrachtet werden. Nach HEYMANS u. Mitarb. sind die vasopressorische Effekte der kleinen Dosen von Nicotin und Lobelin durch die Stimulation von Chemoreceptoren in Glomus caroticum und aorticum verursacht. Unsere Experimente zeigen, daß auch der Effekt

der Stimulation der Pressoreceptoren nicht gehemmt werden kann. Auch die elektrische Reizung des Vagus und Splanchnicus wird mit Ferrosalzlösungen nicht aufgehoben. Dasselbe gilt für den vasopressorischen Effekt des Acetylcholins. Die hypotensive Wirkung des Pentamethoniums wird gleichfalls nicht gehemmt. Diese Wirkung ist durch die Blockade der vasomotorischen Ganglien verursacht (Paton u. Zaimis). Es scheint also, daß alle vasoaktiven Substanzen, die exogen eingeführt werden und direkt auf die glatte Muskulatur der Gefäße wirken, durch das Ferro-Ion gehemmt werden. Auf der anderen Seite üben Substanzen, die über das vegetative Nervensystem wirken (Nicotin, Lobelin, Pentamethonium), ihre vollen Gefäßeffekte trotz der Ferro-Ion-Injektion aus. Das ist auch der Fall bei der Reizung der vegetativen Nerven. In beiden letzten Fällen handelt es sich um endogen freigesetzte chemische Überträgerstoffe des vegetativen Systems. Die kleine Inhibition der Reizung des Splanchnicus kann man mit der Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus den Nebennieren erklären. Nach ipsolateraler Adrenalektomie fällt nämlich diese Hemmung ganz aus. Die Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus den Nebennieren könnte auch die geringe Hemmung des vasopressorischen Effektes des Acetylcholins erklären. Es ist allgemein bekannt, daß sich die exogen verabreichten Substanzen leichter hemmen lassen als wenn sie endogen freigesetzt werden. Atropin inhibiert viel stärker die Wirkung des Acetylcholins als diejenige der Vagusreizung. Das ist wahrscheinlich eine allgemeine pharmakologische Regel, die nicht nur für den spezifischen Antagonisten (Atropin), sondern auch für das unspezifische (Ferro-Ion) gilt. Die Erklärung dieses Phänomens bleibt hypothetisch. Man könnte hierzu die Konzeption der intracellulären Nervenendigungen, wie sie Dale u. Gaddum für den spezifischen Antagonismus zwischen Atropin und Acetylcholin angenommen haben, heranziehen. Nach Župančič handelt es sich einfach um Freisetzung großer Mengen chemischer Überträgersubstanzen in der unmittelbaren Umgebung der Zellen. Solche Konzentrationen der betreffenden Substanzen können selbstverständlich nie mit einer exogenen Einfuhr erzielt werden.

Aus unseren Versuchen ist auch ersichtlich, daß das Ferro-Ion nicht nur die glatte Muskulatur der Gefäße, sondern auch die Muskulatur des Uterus, der Harnblase, des Dünndarmes, der Bronchien und der Nickhaut hemmt. Es scheint also, daß das Ferro-Ion eine allgemeine Hemmung der glatten Muskulatur verursacht. Offenbar handelt es sich hier aber nicht um einen spezifischen Antagonismus, sondern um eine Lähmung des unspezifischen contractilen Mechanismus der glatten Muskulatur. Über die Natur dieser Lähmung läßt sich derzeit wenig sagen. Hermann u. Mitarb. haben versucht, diese Lähmung durch Inhibition der Enzyme, die SH-Gruppen enthalten, zu erklären. Gegen

diese Vorstellung spricht die Tatsache, daß Quecksilberionen als typische „thioloprive" Ionen diese Hemmung nicht zeigen.

Nach Starkenstein besteht ein Antagonismus zwischen Ferro-Ion und Calcium. Calcium spielt im Mechanismus der Muskelkontraktion eine wesentliche Rolle. Vielleicht könnte man in dieser Richtung die Erklärung der Lähmung der glatten Muskulatur durch Ferro-Ionen suchen.

Summary

1. The influence of the ferrous ion on smooth muscles of blood vessels and different organs in situ in anesthetized rabbits, cats and dogs has been investigated.

2. The following vasoactive drugs: adrenaline, noradrenaline, ephedrine, sympatol, vasopressin, angiotonin, ergotamin, barium chloride, acetylcholine and histamine are antagonized by the intravenous infusion of the ferrous sulphate. Ferrous ion does not inhibit the vascular action of nicotine, lobeline and pentamethonium. The vascular effects of electrical stimulation of the great splanchnic and vagus nerve are not inhibited either.

3. The contractions of the uterus (adrenaline), urinary bladder (serotonin) and small intestine (acetylcholine) in rabbits, bronchi (histamine, serotonin) in dogs and nictitating membrane (adrenaline, serotonin) in cats are inhibited by the previous injection of the ferrous sulphate. Ferrous ion does not reduce the contractions of the nictitating membrane produced by electrical stimulation of the cervical sympathetic nerve.

4. The explanations of the obtained results are discussed.

Literatur

Dale, H. H., and J. H. Gaddum: J. Physiol. (Lond.) **70**, 109 (1930).

Edman, P., U. S. von Euler, E. Jorpes and O. T. Sjöstrand: J. Physiol. (Lond.) **101**, 284 (1942).

Hermann, H., J. Chatonnet et J. Vial: Arch. int. Pharmacodyn. **98**, 129 (1954).

Heymans, C.: Actualités pharmacol. **5**, 25 (1956).

Konzett, H., u. R. Rössler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **195**, 71 (1940).

Milković, S., Z. Supek u. J. Taborsky: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 221 (1955).

Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Pharmacol. Rev. **4**, 219 (1952); zit. nach Goodman, L. S., and A. Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York 1955, S. 633.

Starkenstein, E.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **118**, 131 (1926).

Straub, W., u. K. Stefansson: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **194**, 269 (1940).

Takashi Toyoma, Tohoku J. exp. Med. **22**, 196 (1933); zit. nach L. Ther: Pharmakologische Methoden. Stuttgart 1949, S. 285.

Župančič, A. O.: persönliche Mitteilung.

Doz. Dr. Z. Supek, Pharmakologisches Institut der Universität Zagreb, Šalata 11

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 378—386 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler)

Pharmakologische Strukturanalysen am Rinderureter*

Von
H. F. Meyer

(Eingegangen am 25. Juni 1958)

Die pharmakologische Prüfung mit der Gefäßstreifenmethode hat zur Aufklärung der funktionellen Struktur der Muskulatur isolierter menschlicher und tierischer Gefäße entscheidend beigetragen (Häusler 1933, Pichler u. Mitarb. 1953, Häusler u. Filippi 1954, Häusler u. Filippi 1955, Filippi 1955). Weitere Untersuchungen von Herbst u. Meyer (1958) mit dieser Methode gaben Aufschluß über die Funktion der Nierenbeckenmuskulatur. Daran anschließend sollte nunmehr auch der Ureter untersucht werden, von dem histologisch bekannt ist, daß die Muscularis aus einer wechselnd dicken Schichte besteht, die sich aus einem inneren Längsbündel und einer breiten zirkulären Schichte zusammensetzt, wozu im caudalen Drittel noch äußere längsverlaufende Muskelbündel dazukommen (Patzelt 1945).

Der Pharmakaeinfluß sollte darüber hinaus in Hinblick auf die „Peristaltik" des Ureters untersucht werden, wie dies ähnlich von Gould u. Mitarb. (1955), unter besonderer Berücksichtigung nervöser Einflüsse, mit Hilfe des Wasserbüffelureters durchgeführt wurde.

Dementsprechend sollten die Untersuchungen (a) mit Hilfe von Pharmaka nach der von Häusler (1933) ausgearbeiteten Gefäßstreifenmethode die Anordnung der Muskelfasern in verschiedenen Abschnitten des Rinderureters aufzeigen und (b) das Verhalten der nichtaufgeschnittenen Ureterabschnitte bei Innendruckerhöhung mit Überwindung eines Ausgangsdruckes und gleichzeitiger Einwirkung von Pharmaka klären.

Methodik

Die Ureteren wurden gleich nach der Schlachtung den Rindern entnommen[1], in Sauerstoff gesättigte Tyrodelösung gelegt und innerhalb der folgenden 2 Std von dem anhängenden Gewebe freipräpariert. Von den Ureteren wurden je 3 Teile aus den oberen, mittleren und unteren Abschnitten verwendet.

---

* Frau Prof. Dr. C. Zawisch-Ossenitz zum 70. Geburtstag gewidmet als VI. Mitteilung zum Thema (I.: H. Häusler 1933; II.: E. Pichler, W. Lazarini u. R. G. Filippi 1953; III. H. F. Häusler und R. G. Filippi 1954; IV.: R. G. Filippi 1955 (referiert als Vortrag: H. F. Häusler u. R. G. Filippi 1955); V.: R. Herbst u. H. R. Meyer, in Druck in der Zeitschrift: Urol. int. — vgl. Lit. Verz.).

[1] Den Herren Tierärzten des städtischen Schlachthofes Graz gebührt für ihr Entgegenkommen besonderer Dank.

Diese Teile wurden nach der Methode von Häusler (1933) in Ringketten sowie in schraubenförmige und Längsstreifen zerschnitten. Als Längsstreifen wurden entweder nur aufgeschnittene Ureteren oder der Länge nach halbierte verwendet.

Hierauf wurden die Stücke nebeneinander in einem 80 ml fassenden Organbad von 37° C, das als Nährlösung Tyrode enthielt und mit Sauerstoff durchströmt wurde, an Häkchen befestigt. Am oberen Ende führten Fäden zu den 3 isotonen Schreibhebeln (Übersetzung 1:6,5), die die Exkursionen auf einem Rußkymographion aufzeichneten.

Folgende Substanzen wurden auf ihre Wirksamkeit untersucht: Acetylcholin, Adrenalin, Histamin, Hydroxytryptamin (HT), Nicotin, Bariumchlorid, isotone Kaliumchloridlösung, Hexamethonium, Ergotamintartrat.

Bei gelegentlichen Spontankontraktionen wurde die Temperatur um 2—3° C gesenkt. Kontraktionen entstanden von selbst oder folgten auf einen Zug am Faden. Das Auftreten der Spontankontraktionen bei den aufgeschnittenen Abschnitten veranlaßte uns, die Untersuchungen auf ganze Stücke des Ureters zu erweitern. Die Ureteren wurden wie oben angegeben präpariert und in die 3 Abschnitte unterteilt. Die Prüfung und Registrierung erfolgte mit 2 Apparaturen, von denen die eine die Versuchsanordnung nach Trendelenburg (1917) war, nur mit dem Unterschied, daß ein Piston-Recorder statt einer Schwimmerkammer Anwendung fand; die andere Apparatur, die zur Ureter-Durchströmung diente (Lembeck 1958), erlaubte eine gleichzeitige Registrierung von Druckänderung und Durchflußmenge. Beide Organbäder beinhalteten je 50 ml. Die Temperatur betrug 37° C. Es wurde der Einfluß nur jener Substanzen untersucht, die bereits bei den vorangegangenen Untersuchungen mit der Streifenmethode wirksam waren: Acetylcholin, Adrenalin, Histamin und HT.

Ergebnisse

I. Die Wirkung von Acetylcholin, Adrenalin, Histamin, HT, Nicotin, Bariumchlorid und Kaliumchlorid war an Ringen, Schrauben und Streifen fast immer gleichartig (Tab. 1). Die schraubenförmigen Streifen zeigten bei Acetylcholin (12,5—25 μg/ml), Histamin (25 μg/ml) und HT (0,26—1,08 μg/ml) einen geringgradig höheren Prozentsatz von Kontraktionen als die Ringe und Längsstreifen. Adrenalin (25—62,5 μg/ml) verursachte nur sehr unregelmäßige, schwache Kontraktionen. Im Gegensatz dazu scheint der Uretermuskel besonders auf HT empfindlich zu sein, denn schon 0,26 μg/ml zeigten eine Kontraktion. Nicotin (2,5—12,5 μg/ml), Bariumchlorid (25—125 μg/ml) und Kaliumchlorid (30,5—152,5 μg/ml) waren in 11 Versuchen mit einer Ausnahme (geringe Kontraktion auf 125 μg/ml $BaCl_2$ einer Ringkette von einem unteren Ureterabschnitt) völlig unwirksam.

Bei der Prüfung auf ganglionäre Wirkung wurde nach Acetylcholin (12,5—25 μg/ml), 25 μg/ml Hexamethoniumchlorid hinzugefügt und nach erfolgtem Auswaschen die gleiche Dosis Acetylcholin gegeben. In der Regel wurde keine Hemmung des Acetylcholins nach Hexamethonium festgestellt (Tab. 2). Nach Ergotamin (10 μg/ml) trat nur bei den Ringketten der unteren Abschnitte eine Adrenalinhemmung auf (Tab. 2).

Tabelle 1. *Substanzwirkung auf die isolierten Ureteren-Abschnitte*
Zahl der mit Kontraktion reagierenden Ureterenstücke/Zahl der insgesamt geprüften Präparate

Ureter Abschnitte	Substanzen µg/ml						
	Acetylcholin 12.5—25	Adrenalin 25—62.5	Histamin 25	HT 0.26—1.08	Nicotin 2.5—12.5	$BaCl_2$ 25—125	KCl 30.5 bis 152.5
Obere Abschnitte							
Streifen	10/12	4/7	5/7	4/4	0/4	0/4	0/4
Schrauben	12/12	5/7	7/7	4/4	0/4	0/4	0/4
Ringe	11/12	5/7	6/7	3/4	0/4	0/4	0/4
Mittlere Abschnitte							
Streifen	11/11	4/6	6/7	4/4	0/4	0/3	0/4
Schrauben	11/11	4/6	6/7	4/4	0/4	0/3	0/4
Ringe	10/11	4/6	6/7	4/4	0/4	0/3	0/4
Untere Abschnitte							
Streifen	11/12	6/8	5/8	2/4	0/4	0/4	0/3
Schrauben	12/12	5/8	6/8	4/4	0/4	0/4	0/3
Ringe	11/12	5/8	6/8	3/4	0/4	1/4	0/3
Insgesamt							
Streifen	32/35	14/21	16/22	10/12	0/12	0/11	0/11
Schrauben	35/35	14/21	19/22	12/12	0/12	0/11	0/11
Ringe	32/35	14/21	18/22	10/12	0/12	1/11	0/11

Tabelle 2. *Ganglionäre und sympathicolytische Wirkung an isolierten Ureteren-Abschnitten*
Zahl der mit Kontraktion reagierenden Ureterenstücke/Zahl der insgesamt geprüften Präparate

Ureter Abschnitte	Substanzen µg/ml					
	Acetylcholin 12.5—25	Hexamethonium 25	Acetylcholin nach Hexameth. 12.5—25	Adrenalin 25—62.5	Ergotamin 100	Adrenalin nach Ergotamin 25—62.5
Obere Abschnitte						
Streifen	3/3	0/2	2/2	1/3	0/1	1/1
Schrauben	2/3	0/2	1/2	0/3	0/1	0/1
Ringe	3/3	0/2	2/2	1/3	0/1	1/1
Mittl. Abschnitte						
Streifen	2/2	0/2	2/2	1/3	0/1	1/1
Schrauben	1/2	0/2	2/2	0/3	0/1	0/1
Ringe	2/2	0/2	1/2	0/3	0/1	0/1
Untere Abschnitte						
Streifen	3/3	0/3	3/3	3/5	0/3	2/3
Schrauben	3/3	0/3	3/3	1/5	0/3	3/3
Ringe	3/3	0/3	3/3	3/5	0/3	1/3
Insgesamt						
Streifen	8/8	0/7	7/7	5/11	0/5	4/5
Schrauben	6/8	0/7	6/7	1/11	0/5	3/5
Ringe	8/8	0/7	6/7	4/11	0/5	2/5

II. Die Untersuchungen mit Hilfe der Trendelenburgschen Versuchsanordnung zeigten, daß ungefähr die Hälfte der getesteten oberen, mittleren und unteren Ureterabschnitte reaktionslos waren und eine Spontanrhythmik selten zu beobachten war. Eine bloße Erhöhung des Innendruckes genügte meistens nicht, um eine Kontraktion des Abschnittes und die damit verbundene Auspressung der Flüssigkeit aus dem Lumen zu erzielen, sondern erst eine plötzliche Druckwelle (Quetschung des zuleitenden Schlauches) löste eine Kontraktion und Auspressung aus. Die Druckerhöhung, bewegte sich zwischen 2 cm H_2O und 18 cm H_2O. Die meisten Kontraktionen und Auspressungen waren bei einem Druck zwischen 5 cm H_2O und 7 cm H_2O zu beobachten.

Acetylcholin und Adrenalin waren fast immer unwirksam, Histamin führte jedoch oftmals zur direkten Auslösung von Kontraktions- und Auspressungswellen. Nach 20 μg/ml Histamin z. B. genügte eine bloße langsame Druckerhöhung, um den Ureter zu aktivieren, während vorher Druckerhöhung und eine „Druckwelle", d. h. Quetschen, notwendig gewesen war. Wenn HT (1—10 μg/ml) wirksam war, genügte eine Druckerhöhung, um die Kontraktions- und Auspressungswelle auszulösen (Tab. 3).

Eine Variation der Temperatur, d. h. eine Senkung von 37° C auf 35° C oder eine Erhöhung von 37° C auf 39° C, hatte keinen Einfluß, es war weder eine Vermehrung noch eine Verminderung der Kontraktionen festzustellen.

III. In der Versuchsanordnung zur Ureter-Durchströmung zeigte etwa die Hälfte der Ureteren eine Spontanrhythmik (Tab. 4). Bei den oberen Ureterabschnitten lag der wirksame Druck im Lumen, der zumindest Längskontraktionen in Gang brachte, zwischen 4—16 cm H_2O, meistens zwischen 8—10 cm H_2O. Wenn der zur Förderung des Ureterinhaltes am vesicalen Ende zu überwindende Druck um 2 cm H_2O höher als der Druck im Lumen war, so wurde dieser „Ausgangsdruck" sehr oft überwunden, d. h. die Flüssigkeit aktiv ausgepreßt. Bei den oberen Abschnitten wurden 6 cm H_2O als „Ausgangsdruck" nur einmal überwunden. Gewöhnlich zeigte sich aber nur eine geringe Förderleistung, man konnte nur Längskontraktionen beobachten.

Bei den mittleren Abschnitten erstreckte sich der wirksame Bereich des Druckes im Lumen zwischen 4—30 cm H_2O, wobei 14—18 cm H_2O optimal waren. Ein um jeweils 2 cm H_2O höher gelegener „Ausgangsdruck" wurde auch hier in der Mehrzahl der Versuche überwunden. Nur in einem Fall preßte der Ureterabschnitt gegen einen Widerstand (= „Ausgangsdruck") von 8 cm H_2O den Inhalt aus.

Bei den unteren Abschnitten bewirkte ein Druck im Lumen von 2—34 cm H_2O das Einsetzen der Längskontraktionen; mit einer zusätzlichen „Druckwelle" konnten Längskontraktionen und eine Auspressung

Tabelle 3. *Ergebnisse der Trendelenburgschen Versuchsanordnung*
Ureterenabschnitte = Zahl der mit Kontraktion reagierenden Ureterenstücke/Zahl der insgesamt geprüften Präparate

	Obere Abschnitte	Mittlere Abschnitte	Untere Abschnitte
Zahl der Versuche	34	21	24
Reaktionslos	18	10	12
Rhythmische Längskontraktionen	6	2	4
Rhythmische Längskontraktionen und Volumenänderung	0	1	0
Druckerhöhung ergibt Kontraktion und Volumenänderung	9	4	6
Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Längskontraktionen	0	0	1
Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Kontraktion und Volumenänderung	11	6	7
Acetylcholin (10—40 μg/ml), ohne Wirkung	10/11	2/3	3/4
Acetylcholin (20 μg/ml) und Druckerhöhung ergibt Kontraktion und Volumenänderung	1/11	1/3	0/4
Acetylcholin (20 μg/ml), Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Längskontraktion	0/11	1/3	0/4
Acetylcholin (20 μg/ml), Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Kontraktion und Volumenänderung	0/11	0/3	1/4
Adrenalin (20—40 μg/ml), ohne Wirkung	4/5	0/1	3/3
Adrenalin (20 μg/ml) und Druckerhöhung ergibt Kontraktion und Volumenänderung	0/5	1/1	0/3
Adrenalin (20 μg/ml), Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Kontraktion und Volumenänderung	1/5	0/1	0/3
Histamin (1—20 μg/ml), ohne Wirkung	11/19	1/7	4/9
Histamin (1 μg/ml), rhythmische Längskontraktionen	1/19	0/7	0/9
Histamin (2—10 μg/ml) und Druckerhöhung ergibt Kontraktion und Volumenänderung	6/19	2/7	1/9
Nach Histamin (1—10 μg/ml), Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Kontraktion und Volumenänderung	0/19	2/7	0/9
Histamin (1—40 μg/ml), Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Kontraktion und Volumenänderung	8/19	6/7	5/9
Hydroxytryptamin (1—10 μg/ml), ohne Wirkung	8/11	3/6	1/4
Hydroxytryptamin (2—4 μg/ml) und Druckerhöhung ergibt Kontraktion und Volumenänderung	3/11	3/6	3/4
Hydroxytryptamin (4 μg/ml), Druckerhöhung und Druckwelle ergibt Kontraktion und Volumenänderung	1/11	0/6	1/4

des Ureterinhaltes ausgelöst werden. Die größte Förderleistung lag bei einem Druck von 4—16 cm H_2O vor. Auch hier wurde fast immer ein um 2 cm H_2O über dem Druck im Lumen gelegener „Ausgangsdruck" überwunden, einmal wurde die Überwindung eines „Ausgangsdruckes" von 10 cm H_2O registriert. Im Gegensatz zu den mittleren Abschnitten, bei denen gute Förderleistungen zu verzeichnen waren, zeigten die unteren Abschnitte eine sehr geringe Fördermenge.

Tabelle 4. *Ergebnisse der Ureter-Durchströmungsapparatur*
Ureterenabschnitte = Zahl der mit Kontraktion reagierenden Ureterenstücke/Zahl der insgesamt geprüften Präparate

	Obere Abschnitte	Mittlere Abschnitte	Untere Abschnitte
Zahl der Versuche	8	8	10
Kontraktionen auf Druckwelle . . .	6/8	6/8	8/10
Kontraktionen auf Druckerhöhung und Druckwelle	6/8	6/8	5/10
Rhythmische Längskontraktionen .	3/8	3/8	4/10

Allgemein kann man sagen, daß von einem aktiven Abschnitt ein „Ausgangsdruck", der um 2 cm H_2O über dem Druck im Lumen lag, meist überwunden wurde. Mit zunehmender Ausgangsdruckhöhe nahm jedoch die Fähigkeit, denselben zu überwinden, rasch ab. Auch bei diesen Versuchen konnte in einem Falle eine Druckwelle (plötzliche Quetschung) und der damit verbundene plötzliche Druckanstieg als ein auslösendes Moment des Kontraktions-Auspressungseffektes beobachtet werden. Kontraktionen, die bei einem höheren „Ausgangsdruck" beobachtet werden konnten, waren ohne Förderleistung, sie lassen auf eine bloße Kontraktion der Ureter-Längsmuskulatur schließen.

2 μg/ml HT vermehrten die Kontraktionen, ohne daß es zu einer Förderung kam. Gibt man mehrmals die gleiche Konzentration von HT hintereinander, so bekommt man nur das erste Mal eine Vermehrung der Kontraktionswellen. 2—20 μg/ml Histamin führten ebenfalls zu vermehrten Kontraktionen. Nach 20 μg/ml Adrenalin kamen bestehende Kontraktionen zum Stillstand. 20 μg/ml Noradrenalin hatten keinen Effekt gezeigt.

Ein Austausch der Tyrode gegen Lockesche Lösung ließ keine Änderung des Verhaltens des Ureters beobachten. Eine Senkung von 37° C auf 35° C oder eine Erhöhung auf 39° C hatte auch bei Anwendung dieser Methode keinen Einfluß.

Diskussion

Die oberen, mittleren und unteren Ureterabschnitte, sowie auch die einzelnen Streifenpräparate (Längs-, Ring- und Spiralstreifen) des isolierten Rinderureters weisen trotz verschiedener Stärke der

Muskelschichten in ihrer Reaktion auf Pharmaka nur geringe Unterschiede auf. Man kann daher annehmen, daß die funktionelle Struktur im wesentlichen einer längs- und ringförmigen Anordnung von Muskelfasern entspricht und kein ausgesprochen schraubenförmiger Funktionstyp vorliegt. In einem schraubenförmig geschnittenen Ureterpräparat wirken längs- und ringförmige Faseranteile diagonal zusammen.

Die tonussteigernde und kontraktionsfördernde Wirkung von Adrenalin, wie sie von Macht (1916) und Gould u. Mitarb. (1955) festgestellt wurde, konnte bei den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Macht (1916), der seine Studien unter anderem ebenfalls an Streifen- und Ringpräparaten des Rinderureters anstellte, berichtete, daß die Organe 3 Tage auf Eis überlebend erhalten werden können, was auch wir bestätigen. Die bei 4° C aufbewahrten Ureteren reagierten im Allgemeinen am zweiten Tag am besten. Die Spontanrhythmik setzte meistens ein, wenn das Organ in die warme Nährlösung (37° C) gebracht wurde.

Im Gegensatz zu den Befunden Machts (1916), der eine stimulierende Wirkung des Nicotins in kleinen Dosen und eine Adrenalin-Umkehr nach Ergotoxin fand, stehen unsere Beobachtungen, bei denen all diese Erscheinungen nicht registriert werden konnten. Übereinstimmend mit Gould u. Mitarb. (1955) können wir die kontrahierende Wirkung des Acetylcholins und die Unwirksamkeit von $BaCl_2$ bestätigen.

Eine Unterschiedlichkeit des Verhaltens der nicht aufgeschnittenen Ureterabschnitte ist auch bei Einwirkung von Substanzen zu bemerken. Prosser u. Mitarb. (1955) konstatierten rhythmische Kontraktionen nach lokaler Applikation von Acetylcholin am Rattenureter. Chen u. Mitarb. (1957) stellten keine Wirkung nach Acetylcholin, eine flüchtige nach Adrenalin fest. Noradrenalin bewirkte bei 80% der Versuche, ebenso wie Histamin, eine Verstärkung der Kontraktionen. Diese aktivierende Wirkung von Histamin beobachtete schon Gruber (1928). Für unsere Versuche ist die Histamin- und HT-Wirkung besonders bemerkenswert, da die auf Druckwellen nicht reagierenden Präparate nach dem Hinzufügen dieser Substanzen eine außerordentliche Reaktionsfähigkeit erkennen ließen. Temperaturänderungen, d. h. von 37° C auf 35° C und von 37° C auf 39° C, hatten auch bei uns, wie bei den langsamen Temperaturänderungen von Kolberg (1955), keinen Einfluß.

Die Ergebnisse der Streifenmethode (I), sowie der 2 anderen Methoden (II, III) zeigen deutlich, daß nur etwa die Hälfte der untersuchten Abschnitte überhaupt reagierten, sei es auf Änderung des Innendruckes oder auf Einwirkung von ureterwirksamen Substanzen. Eine Ursache dafür konnten wir nicht finden, da z. B. auch 2 Ureteren von ein und demselben Tier verschieden reagierten. Dies konnten auch Chen u. Mitarb. (1957) und Kolberg (1955) beobachten. Man kann daher nur an

Hand von zahlreichen Beobachtungen vorsichtige Schlüsse und Folgerungen ziehen.

Eine Spontanrhythmik konnten Engelmann (1869) und Sokoloff u. Luchsinger (1881) sowohl an zerteilten, wie auch an im Ganzen belassenen Ureteren beobachten, was durch unsere Untersuchungen bestätigt werden kann, wobei wir auch bei den Streifenpräparaten diese Beobachtung machen konnten. Peristaltische Wellen konnten von Engelmann (1869) und Sokoloff u. Luchsinger (1881) durch Quetschung der Muscularis bzw., so wie in unseren Versuchen, durch rasche Druckwellen ausgelöst werden, worin ein Beweis für das Fehlen von Ganglienzellen gesehen wurde. Auch von Gruber (1930), welcher zusätzlich eine Förderung dieser Kontraktionswellen durch Adrenalin beschrieb, und von Butcher u. Sleator (1955) wurde eine Ausbreitung der Wellenbewegung nach beiden Seiten beobachtet, die jedoch Gould u. Mitarb. (1955) und auch wir nicht sahen; vielmehr ging der Wellenablauf immer von dem der Niere zugekehrten Ende ureterabwärts vonstatten.

Der älteren Ansicht, daß die Harnleiterbewegung vom zentralen und peripheren Nervensystem gesteuert wird (Valentin 1844, Maier 1881), stehen die neueren Befunde entgegen, daß die Kontraktionen vom auslösenden Reiz des aus dem Nierenbecken austretenden Harntropfens abhängig sind, d. h. ein mechanischer Dehnungsreiz ist kontraktionsauslösend (Lewin u. Goldschmidt 1893, Sleator u. Butcher 1955, Gould u. Mitarb. 1955). Unsere Befunde zeigen ebenfalls, daß eine Rhythmik, die zur Förderung in vesicaler Richtung befähigt ist, am isolierten Ureter vorhanden ist, die durch Pharmaka oder rasche Druckwellen ausgelöst werden kann. Diese Rhythmik ist auch nach Lagerung des Ureters über mehrere Tage noch vorhanden und weist gemeinsam mit der Unwirksamkeit von Nicotin darauf hin, daß rein myogene Kontraktionen den Flüssigkeitstransport bewirken, wobei die Druckwelle den auslösenden Reiz darstellt.

Zusammenfassung

An verschiedenen Abschnitten von isolierten Rinderureteren wurde nach der Gefäßstreifenmethode die funktionelle Struktur der Muskelfasern untersucht. Die zur Kontraktion führenden Substanzen (Acetylcholin, Adrenalin, Histamin und Hydroxytryptamin) zeigten fast immer an den Längs-, schraubenförmigen Streifen- und Ringketten-Präparaten eine gleichartige Wirkung, während andere unwirksame Stoffe (Nicotin, Bariumchlorid und Kaliumchlorid) an keinem der Streifen-Präparate wirkten. Daraus wird geschlossen, daß kein schraubenförmiger Funktionstyp vorliegt.

Die experimentelle Erzeugung rhythmischer Kontraktionen an nicht aufgeschnittenen Ureterabschnitten war sowohl durch rasche Druckwellen als auch durch Pharmaka (Histamin und Hydroxytryptamin) möglich. Diese peristaltischen Wellen können die Flüssigkeit gegen einen um 2 cm H_2O höheren Widerstand am vesicalen Ende auspressen.

Literatur

Butcher, jr., H. R., and W. Sleator, jr.: J. Urol. (Baltimore) **73**, 970 (1955).

Chen, jr., Ph. S., V. M. Emmel, J. A. Benjamin and V. Distefano: Arch. internat. Pharmacodynamie **110**, 131 (1957).

Engelmann, Th. W.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **2**, 243 (1869).

Filippi, R. G.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **226**, 449 (1955).

Gould, D. W., A. C. L. Hsieh and L. F. Tinckler: J. Physiol. (Lond.) **129**, 425 (1955).

Gruber, C. M.: J. Pharmacol. exp. Ther. **34**, 203 (1928); **39**, 449 (1930).

Häusler, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **172**, 302(1933).

Häusler, H. F., u. R. G. Filippi: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 187 (1954); **225**, 147 (1955).

Herbst, R., u. H. R. Meyer: in Vorbereitung.

Kolberg, A.: Acta pharmacol. (Kbh.) **11**, 328 (1955).

Lembeck, F.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **265**, 567 (1958).

Lewin u. Goldschmidt: zit. nach Protopopow.

Macht, D. J.: J. Pharmacol. exp. Ther. **8**, 155 (1916).

Maier, R.: zit. nach Protopopow.

Patzelt, V.: Histologie, 1. Aufl., Wien: Urban & Schwarzenberg 1945.

Pichler, E., W. Lazarini u. R. G. Filippi: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 420 (1953).

Prosser, C. L., Ch. E. Smith and C. E. Melton: Amer. J. Physiol. **181**, 651 (1955).

Protopopow, S. A.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **66**, 1 (1897).

Sleator, jr., W., and H. R. Butcher, jr.: Amer. J. Physiol. **180**, 261 (1955).

Sokoloff, O., u. B. Luchsinger: Pflügers Arch. ges. Physiol. **26**, 464 (1881).

Trendelenburg, P.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **81**, 55 (1917).

Valentin: zit. nach Protopopow.

Dr. H. F. Meyer, Pharmakologisches Institut der Universität Graz, Österreich

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 387—389 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler)

Über die Leistungsreserve des hyperthermen Herzmuskels am Herz-Lungen-Präparat der Ratte

Von
Karl Neuhold

(Eingegangen am 25. Juni 1958)

Bei der Weiterführung der Versuche von Kukovetz (1957) am Herz-Lungen-Präparat der Ratte (HLP) über die Leistungsreserve des Herzmuskels bei Unterkühlung wurden, ebenfalls auf Veranlassung von H. F. Häusler, die im folgenden beschriebenen Versuche bei Hyperthermie durchgeführt. Es sollte dabei festgestellt werden, ob sich auch in Hyperthermie die Leistungsreserve, die wir durch arterielle und venöse Belastung unter Anwendung der Starlingschen Herzgesetze prüften, ändert.

Das Ziel auch dieser Untersuchung war darauf ausgerichtet, die Wirkungen von Pharmaka am Herzen in Hypo- und Hyperthermie, ähnlich wie dies für den Gesamtorganismus hinsichtlich der Unterkühlung teils geschehen ist und vielfache Wirkungsänderungen gezeigt hat (Kopera 1957), zu prüfen.

Methodik

Bezüglich der Versuchsanordnung hielten wir uns an die oben erwähnte Arbeit von Kukovetz. Die Wiedererwärmung der Versuchspräparate wurde in 15 bis 20 min über mehrere Zwischenstufen durchgeführt, da sich eine Temperaturerhöhung ohne Pausen immer ungünstig auf das Präparat auswirkte.

Die Blutgewinnung bei den Spendertieren führten wir in Äthernarkose durch, wobei wir 10 min vor der Entnahme durch Kanülierung einer A. carotis 1000 E Heparin in die Schwanzvene injizierten[1]. Bei diesem Vorgehen reicht die Blutmenge von 2 Spendertieren für den Versuch aus. Auch wir verdünnten die gewonnene Blutmenge durch Zugabe von 2 ml einer 1%igen Kochsalzlösung zu je 10 ml Blut.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in den beiden Tabellen wiedergegeben. Bei arterieller Belastung (Tab. 1) zeigte sich, daß das Rattenherz nach dem Übergang von 37° C auf 40° C immer weniger stark

[1] Für die Überlassung von Heparin danken wir der Fa. Sanabo, Wien.

belastbar wird. Bei einer neuerlichen Belastung bei 37° C war in der Hälfte der Versuche ein Wiederansteigen der Belastbarkeit, bei der anderen Hälfte ein Gleichbleiben gegenüber der Belastung bei 40° C festzustellen. Wenn man aus allen Versuchen den Mittelwert der arteriellen Belastbarkeit errechnet, so ergibt sich eine etwa 20% geringere Leistungsreserve bei Hyperthermie. Das Minutenvolumen zeigte im Versuchsverlauf gleichfalls eine Abnahme, die sich nach Erhöhung der Temperatur auf 40° C etwas verstärkt.

Tabelle 1. *Maximale arterielle Belastbarkeit (Erhöhung des peripheren Widerstandes) des Rattenherzens in Millimeter Hg*

In Klammern die Minutenvolumina

	37° C		40° C		37° C
1	170 (16,8)	>	140 (16,4)	=	140 (14,4)
2	140	>	90	=	90
3	60 (18,0	>	40 (15,8)	=	40 (14,0)
4	170 (18,0)	>	100 (18,2)	<	160 (12,6)
5	90 (20,4)	>	70 (18,0)	<	90 (15,6)
6	80 (25,5)	>	70 (22,0)	<	90 (20,4)
Mittelwert	118 (19,8)	>	85 (18,0)	<	101 (15,4)

Tabelle 2. *Maximale venöse Belastbarkeit (Hebung des venösen Vorratsgefäßes) des Rattenherzens in Millimeter Blut*

In Klammern die Minutenvolumina

	37° C		40° C		37° C
1	120	>	90	=	90
2	290 (8,8)	>	190 (7,4)	<	250 (7,0)
3	210 (15,2)	>	130 (12,4)	<	140 (16,6)
4	190	>	80	<	210
5	180 (16,0)	>	100 (16,4)	<	140 (16,5)
6	160 (14,4)	>	90 (13,4)	<	100 (12,8)
Mittelwert	190 (13,6)	>	110 (12,4)	<	150 (13,0)

Bei venöser Belastung (Tab. 2) ist die Kraftreserve des Rattenherzens bei 40° C ebenfalls geringer als bei 37° C. Eine wiederholte Belastung bei 37° C zeigt in einem Versuch ein Gleichbleiben der Belastbarkeit, in 5 Versuchen einen Wiederanstieg der Leistungsreserve, wobei die Belastbarkeit der ersten Testung bei 37° C, wenn man die Mittelwerte in Betracht zieht, allerdings nicht immer erreicht wird. Das Minutenvolumen ändert sich in unseren Versuchen nicht wesentlich. Der Abfall erfolgte bei arterieller Belastung rascher als bei venöser Belastung.

Als Ergebnis resultiert aus den durchgeführten Versuchen, daß das Rattenherz mit ansteigender Temperatur eine Abnahme der Leistungsreserve zeigt. Diese Tatsache tritt sowohl bei arterieller als auch bei venöser Belastung auf. Die Herzkraft ist also bei 27° >, 32° >, 37° >, 40° C.

Zusammenfassung

Das Ratten-Herz-Lungen-Präparat zeigt bei arterieller und venöser Belastung eine Abnahme der Leistungsreserve bei 40° C gegenüber 37° C.

Literatur

Kopera, H.: Arch. int. Pharmacodyn. **112**, 405 (1957).
Kukovetz, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 496 bis 506 (1957).

Dr. K. Neuhold, Pharmakologisches Institut der Universität Graz, Österreich

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 390—399 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke) und dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. A. Lindner)

Zur Beeinflussung des Formolödems der Rattenpfote durch nervöse und humorale Faktoren

Von
G. Hertting und E. Stoklaska

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Juni 1958)

Ein entzündungserregendes Agens ruft in dem von ihm betroffenen Organismus zunächst an seiner Einwirkungsstelle *lokale* entzündliche Prozesse hervor; dann kommt es, in den meisten Fällen, zum Auftreten von *Allgemeinreaktionen*. Beide sind in Form und Ablauf weitgehend abhängig vom Wirkungsmechanismus der sie erzeugenden Ursache.

Für die initialen, örtlichen Veränderungen wurden zuerst von Henle (1846) und später von Ricker (1922) primär auftretende nervöse Mechanismen verantwortlich gemacht. Diese Genese wird heute weitgehend abgelehnt: es wird eine direkte Alteration des Entzündungsfeldes durch das entzündungerregende Agens selbst, seine Produkte und sekundär im Gewebe entstehende Substanzen angenommen und nervösen Einflüssen dabei eine nur unbedeutende Rolle zugeschrieben. Diese Ansicht wurde zuerst von Cohnheim (1867), später immer wieder, so von Wooley (1915), und zuletzt von Florey (1958) vertreten. Gestützt wurde sie unter anderem durch die Beobachtung, die schon v. Recklinghausen (1883) machte, daß Gewebe selbst bei völliger Lähmung nicht von Entzündung verschont bleiben.

Demgegenüber stehen Befunde anderer Autoren: So ist nach Spiess (1906) das Auftreten eines entzündlichen Prozesses, d. h. die Initialstadien einer Entzündung, weitgehend abhängig von einem nervösen Reflex, der vom Entzündungsherd ausgeht und sich durch Lokalanästhesie ausschalten läßt. Dieser Reflex wurde dann von Bruce (1910) auf Grund eingehender Untersuchungen über seinen Mechanismus als Axonreflex aufgefaßt. Ein solcher ist nach Lewis and Grant (1924) auch für die Hofbildung, wie sie bei der durch Histamin in der menschlichen Haut verursachten sogenannten „Dreifachen Reaktion" auftritt, verantwortlich zu machen.

Daneben wurde auch immer wieder der Einfluß des autonomen, besonders des sympathischen Nervensystems auf entzündliche Gewebsveränderungen betont. Das erstemal 1890 von Samuel und später von Meltzer and Meltzer (1903), Inutsuka (1928) und anderen. Auch die Arbeiten von Riechert u. Klein (1951) sowie von Marquardt, Meyer

u. Schumacher (1957), in denen eine starke Hemmung experimenteller Entzündungen durch Sympathikolytica gezeigt werden konnte, legen den Gedanken einer Beeinflussung entzündlicher Prozesse durch das autonome Nervensystem nahe.

Die im Laufe einer Entzündung über die lokalen Veränderungen hinausgehende Auswirkung auf den Gesamtorganismus besteht im wesentlichen in einer Stimulierung des ZNS und des Hypophysen-Nebennierensystems. Die dadurch bedingten Allgemeinreaktionen können dann ihrerseits zum Teil das örtliche entzündliche Geschehen beeinflussen. Als Weg für diese Stimulierung kommt neben dem humoralen auch der nervale in Betracht. So konnte Haas (1958) zeigen, daß bei gewissen Entzündungen nach Durchschneidung des peripheren Nerven manche Allgemeinreaktionen ausbleiben und auch der örtliche Prozeß abgeschwächt wird, und Theobald (1955) fand bei Rückenmarkdurchschneidung eine Hemmung des Formalinödems, die er auf ein Fehlen der nervösen Übermittlung zurückführte. Die intakte Nervenversorgung eines Entzündungsfeldes könnte sich demnach nicht nur unmittelbar auf das örtliche Entzündungsgeschehen auswirken, sondern auch mittelbar durch Auslösung allgemeiner Reaktionen.

Zu diesen skizzierten Problemen soll die vorliegende Arbeit ein Beitrag sein. An einem bestimmten Entzündungsmodell werden nervöse und humorale Einflüsse, getrennt bzw. in ihrer gegenseitigen Abhängigkeit, untersucht. Wir wählten das Formolödem der Rattenpfote: hier gelingt es mit einer gut reproduzierbaren Meßmethode zumindest ein Kriterium der Entzündung — die Schwellung — an wachen Tieren über einen längeren Zeitraum exakt quantitativ zu erfassen.

Methodik

Als Versuchstiere verwendeten wir insgesamt 180 weibliche Albino-Ratten eines Glaxo-Inzuchtstammes im Gewicht von 160—220 g. Alle Tiere standen vor Versuchsbeginn mindestens 3 Tage unter normalen Laboratoriumsbedingungen. Die Nahrung bestand aus Rattenkeks (Lembeck) und Wasser ad libitum. Die Ratten wurden in 6 Gruppen zu je 30 Tieren aufgeteilt und die einzelnen Gruppen wie folgt behandelt:

Tabelle 1

Gruppe	7 Tage vor Ödemerzeugung	24 Std vor Ödemerzeugung	Ödemerzeugung in
1	Denervierung einer Pfote		innerv. Pfote u. denerv. Pfote
2	Denervierung einer Pfote	Adrenalektomie	innerv. Pfote u. denerv. Pfote
3			innerv. Pfote
4	Denervierung einer Pfote		denerv. Pfote
5		Adrenalektomie	innerv. Pfote
6	Denervierung einer Pfote	Adrenalektomie	denerv. Pfote

Bei den Tieren der Gruppe 1 und 2 erzeugten wir demnach das Formolödem gleichzeitig in beiden Hinterpfoten, bei denen der Gruppen 3, 4, 5 und 6 nur in einer, um festzustellen, inwieweit und in welcher Art eine Entzündung einer Pfote eine gleichzeitig mit ihr in der anderen erzeugte beeinflußt.

Die Denervierung wurde 7 Tage vor Versuchsbeginn vorgenommen. In Äthernarkose wurde der Nervus ischiadicus knapp nach seinem Austritt aus dem kleinen Becken und der Nervus femoralis auf transperitonealem Wege dargestellt und aus beiden Nerven ein etwa 5 mm langes Stück reseziert. Die Adrenalektomie wurde 24 Std vor der Ödemerzeugung in der üblichen Weise durchgeführt. Nachher erhielten diese Tiere statt Wasser eine 1%ige Kochsalzlösung ad libitum. Zur Erzeugung des Ödems injizierten wir in die Hinterpfoten 0,1 ml einer 1%igen Formollösung.

Zur Erfassung des Schwellungsgrades und -ablaufes maßen wir an den wachen Tieren unmittelbar nach der Formolinjektion sowie nach 30, 60, 90 min und 2, 3, 4, 5, 8, 24, 72 Std mittels eines Dickenmeßgerätes den dorso-plantaren Durchmesser der Pfote. Einzelheiten über Messung und Erzeugung des Ödems bei Hertting u. Stoklaska.

Ausgangswert der Schwellung (= Nullinie auf den Abbildungen) ist die Dicke der Pfote unmittelbar nach der Formolinjektion. Die Mittelwerte der Differenzen zwischen den Schwellungswerten nach den angeführten Zeitabständen und dem Ausgangswert sowie die mittleren Fehler der Mittelwerte wurden berechnet.

Ergebnisse

Die Schwellungsabläufe des Formolödems unter den — in der Methodik angegebenen — verschiedenen Bedingungen sind in Abb. 1, 2, 3 *graphisch* wiedergegeben. Diese Darstellung veranschaulicht die Einzelheiten und Besonderheiten jedes Schwellungsverlaufes besser als eine noch so genaue Beschreibung im Text und läßt auch die mit der erwähnten Meßmethode erfaßbaren Einflüsse auf den Entzündungsprozeß besser erkennen, als ein gesonderter statistischer Vergleich der einzelnen Schwellungswerte.

Zahlenmäßig sind die Ergebnisse in Tab. 2 wiedergegeben.

Abb. 1. Verlauf des Formolödems bei *beiderseitiger* Ödemerzeugung. Tiere mit Nebennieren (Gruppe 1) in den innervierten Pfoten (————); in den denervierten Pfoten (--------). Tiere ohne Nebennieren (Gruppe 2) in den innervierten Pfoten (—·—·—·—); in den denervierten Pfoten (—··—··—) Abszissen: Zeit in Stunden. Ordinaten: mittlere Zunahmen der dorsoplantaren Pfotendurchmesser in Hundertstel Millimeter nach Injektion von 0,1 ml einer 1%igen Formollösung.

Abb. 2. Verlauf des Formolödems bei *einseitiger* Ödemerzeugung. In den innervierten Pfoten von Tieren mit Nebennieren (Gruppe 3 ————); in den denervierten Pfoten von Tieren mit Nebennieren (Gruppe 4------); in den innervierten Pfoten von Tieren ohne Nebennieren (Gruppe 5 —·—·—); in den denervierten Pfoten von Tieren ohne Nebennieren (Gruppe 6 —··—··—) Abszissen und Ordinaten wie in Abb. 1

Abb. 3. Verlauf des Formolödems in innervierten Pfoten von Tieren mit Nebennieren. a bei einseitiger Ödemerzeugung (————); b bei beidseitiger Ödemerzeugung (------)
Verlauf des Formolödems in denervierten Pfoten von Tieren ohne Nebennieren. a bei einseitiger Ödemerzeugung (—·—·—·—); b bei beidseitiger Ödemerzeugung (—··—··—)
Abszissen und Ordinaten wie in Abb. 1.

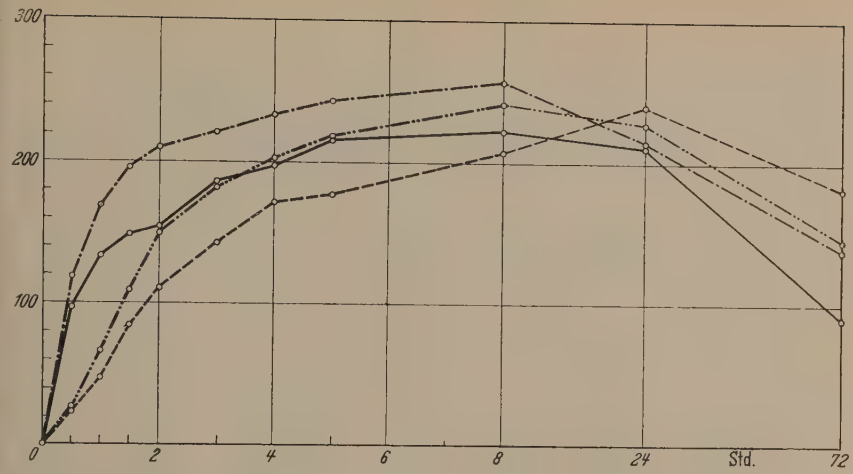


Abb. 1

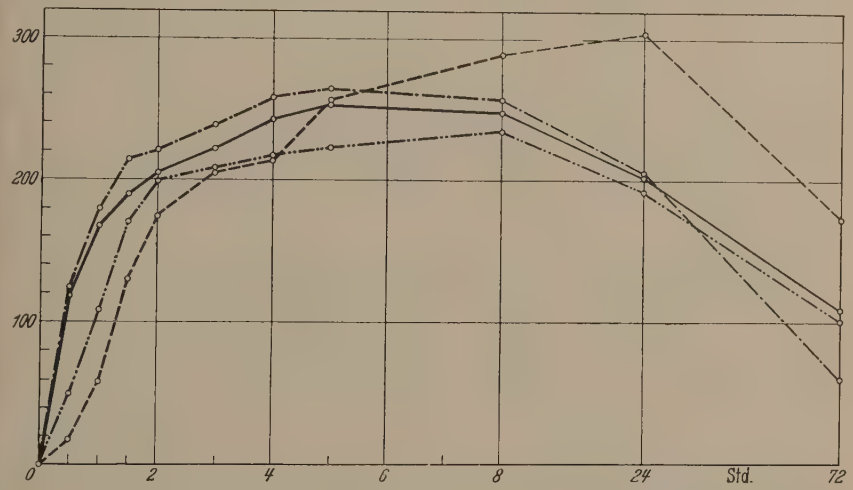


Abb. 2

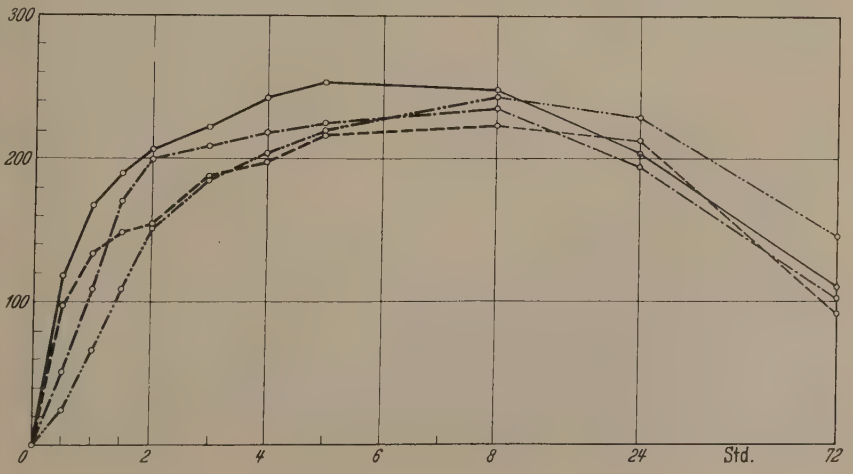


Abb. 3

Tabelle 2. *Mittlere Zunahmen der dorso-plantaren Pfotendurchmesser (Schwellungszunahmen) in Hundertstel Millimeter und mittlere Fehler der Mittelwerte*

nach	Gruppe 1 (mit NN)		Gruppe 2 (ohne NN)		Gruppe 3 (mit NN)	Gruppe 4 (mit NN)	Gruppe 5 (ohne NN)	Gruppe 6 (ohne NN)
	innerv. Pf.	denerv.Pf.	innerv. Pf.	denerv.Pf.	innerv. Pf.	denerv.Pf.	innerv. Pf.	denerv.Pf.
30 min	97,0 ± 7,86	22,3 ± 4,56	118,3 ± 8,23	25,3 ± 4,79	118,3 ± 6,31	17,3 ± 6,10	125,3 ± 7,70	50,3 ± 6,06
60 min	133,3 ± 8,88	47,0 ± 7,40	168,0 ± 10,15	65,6 ± 7,44	167,3 ± 6,69	58,0 ± 9,60	179,3 ± 8,92	108,3 ± 8,53
90 min	148,3 ± 9,35	84,0 ± 9,43	196,0 ± 9,96	109,0 ± 10,14	190,0 ± 8,55	128,6 ± 14,07	214,3 ± 9,11	170,0 ± 9,02
2 Std	153,7 ± 10,20	111,0 ± 9,18	210,0 ± 10,75	150,3 ± 10,77	204,7 ± 8,11	174,0 ± 10,99	220,6 ± 9,69	199,0 ± 8,12
3 Std	186,3 ± 10,19	142,7 ± 12,26	220,6 ± 11,78	185,6 ± 9,27	222,3 ± 8,92	207,0 ± 8,51	238,6 ± 8,80	208,0 ± 9,05
4 Std	198,3 ± 11,44	171,7 ± 12,75	234,3 ± 11,78	202,6 ± 9,75	242,7 ± 8,63	214,0 ± 20,00	258,6 ± 7,95	218,0 ± 10,99
5 Std	216,0 ± 12,03	177,7 ± 11,85	243,3 ± 12,37	219,0 ± 8,63	253,3 ± 8,79	256,6 ± 9,57	264,3 ± 8,42	223,0 ± 10,84
8 Std	223,0 ± 10,90	208,3 ± 11,97	257,6 ± 12,82	243,0 ± 7,13	248,3 ± 11,02	289,0 ± 9,44	258,3 ± 10,35	235,3 ± 13,07
24 Std	212,3 ± 9,77	241,3 ± 13,83	216,3 ± 12,03	227,6 ± 9,30	203,3 ± 13,46	304,0 ± 11,06	196,3 ± 10,21	193,3 ± 17,14
72 Std	91,0 ± 13,57	183,0 ± 8,57	138,6 ± 12,19	145,6 ± 12,06	109,7 ± 13,26	173,9 ± 11,36	61,0 ± 9,90	102,3 ± 14,74

Wird bei Tieren mit Nebennieren und intakter Nervenversorgung der Extremitäten das Formolödem nur in einer Pfote erzeugt, so nimmt die Schwellung dieser Pfote in der ersten Stunde sehr stark, später nur allmählich zu und erreicht ihr Maximum nach 5 Std. Der Schwellungswert nach 8 Std liegt noch fast gleich hoch und erst nach diesem Zeitpunkt erfolgt eine stärkere Schwellungsabnahme (siehe Schwellungsverlauf bei den Tieren der Gruppe 3 in Abb. 2).

Dieser geschilderte Schwellungsverlauf des Formolödems in einer Pfote wird verändert durch:

1. eine Adrenalektomie,
2. eine Denervierung dieser Pfote,
3. eine gleichzeitig in der anderen Pfote vorgenommene Ödemerzeugung.

Die durch Adrenalektomie bzw. Denervierung bewirkten Veränderungen zeigen sich dabei in gleicher Weise in den Versuchen mit beidseitiger (Abb. 1) und einseitiger Ödemerzeugung (Abb. 2).

ad 1. Beeinflussung des Schwellungsablaufes durch Adrenalektomie. Der Schwellungsablauf bei Tieren ohne Nebennieren zeigt gegenüber den bei Tieren mit Nebennieren folgende Besonderheiten:

Tabelle 3

	in innerv. Pfoten	in denerv. Pfoten
Schwellungs-Zunahme	beschleunigt	
Maximaler Schwellungswert	wird nach der gleichen Zeit erreicht, liegt höher	wird viel früher erreicht, liegt niedriger bzw. gleich hoch
Schwellungs-Abnahme	setzt zur gleichen Zeit ein	setzt früher ein
Schwellungswert nach 72 Std		liegt niedriger

ad 2. Beeinflussung des Schwellungsablaufes durch Denervierung. Der Schwellungsablauf in denervierten Pfoten zeigt gegenüber den in innervierten folgende Besonderheiten:

Tabelle 4

	bei Tieren mit NN	bei Tieren ohne NN
Schwellungs-Zunahme	verzögert	
Maximaler Schwellungswert	wird später erreicht, liegt höher	wird nach der gleichen Zeit erreicht, liegt niedriger
Schwellungs-Abnahme	setzt später ein	setzt zur gleichen Zeit ein
Schwellungswert nach 72 Std	liegt höher	liegt etwa gleich hoch

ad 3. Beeinflussung des Schwellungsablaufes durch eine gleichzeitig in der anderen Pfote vorgenommene Ödemerzeugung.

Stellt man die entsprechenden, d. h. unter gleichen Bedingungen erzeugten, Entzündungsabläufe bei Tieren mit einseitig und beidseitig erzeugtem Ödem einander gegenüber — wie dies für 2 Fälle in Abb. 3 geschehen ist — so sieht man, daß der Schwellungsverlauf einer Pfote durch eine gleichzeitige Ödemerzeugung in der anderen Pfote in folgender Weise beeinflußt wird:

Tabelle 5

	bei Tieren mit NN	bei Tieren ohne NN
Schwellungs-Zunahme	verzögert, dies zeigt sich am deutlichsten nach 2 Std: im allgemeinen liegen die Schwellungswerte um etwa 25—35% tiefer, lediglich die von innerv. Pfoten adrenalekt. Tiere nur um 10%	
Maximaler Schwellungswert	liegt tiefer	liegt etwa gleich hoch
Schwellungswert nach 72 Std	liegt etwa gleich hoch	liegt höher

Diskussion

Unsere Versuchsergebnisse hinsichtlich des Einflusses einer *Adrenalektomie* auf das Formolödem der Rattenpfote stehen — soweit sie sich auf die Schwellung von Pfoten mit intakter Nervenversorgung beziehen — in Einklang mit den Ergebnissen vieler anderer Autoren, die eine ähnliche verstärkende Wirkung einer Adrenalektomie auf andere experimentell erzeugte Pfotenödeme beschreiben: Halpern u. Briot (1950), Riechert u. Klein (1951), Scheiffarth u. Berg (1952), Heilmeyer, Frey u. Fischer (1952). Lediglich Theobald u. Domenjoz (1955) berichten über einen vermindernden Einfluß einer Adrenalektomie auf das Formolödem. Einen solchen können auch wir — allerdings erst nach 24 Std und nur schwach angedeutet — bei den Tieren beobachten, denen die Entzündung nur in den innervierten Pfoten erzeugt wurde (vgl. den Schwellungsablauf bei den Tieren der Gruppe 3 u. 5 in Abb. 2). Vor dem genannten Zeitpunkt ist die Schwellung bei den adrenalektomierten Tieren (Gruppe 5) nur unbedeutend stärker als bei den nicht adrenalektomierten Tieren (Gruppe 3); dieses Verhalten möchten wir darauf zurückführen, daß bei letzteren die Schwellung bereits so bedeutend ist, daß die Adrenalektomie nur noch eine geringe Verstärkung bewirken kann. Der Einfluß einer Adrenalektomie auf den Schwellungsprozeß ist daher je nach dessen Intensität sowie dem Zeitpunkt der Beobachtung in Art und Ausmaß verschieden. Dies könnte, da Theobald u. Domenjoz (1955) zur Entzündungserzeugung stärkere Reize (0,1 ml einer 3%igen! Formollösung) verwenden, die teilweise Diskrepanz ihrer und unserer Befunde erklären.

Worauf der Einfluß einer Adrenalektomie im einzelnen beruht, war nicht Gegenstand unserer Arbeit; wir möchten jedoch erwähnen, daß eine Adrenalektomie imstande ist, zunächst schon das Entzündungsfeld (Bindegewebs-Grundsubstanz und terminale Strombahn) sowie dann das Entzündungsgeschehen in jeder Phase zu beeinflussen.

Zu den in der Einleitung wiedergegebenen Ansichten bezüglich der Bedeutung von *Nerveneinflüssen* für das Entzündungsgeschehen möchten

wir auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse, wie folgt, Stellung nehmen: Das Auftreten der lokalen entzündlichen Veränderungen an sich ist — zumindest beim Formolödem — weitgehend unabhängig vom Vorhandensein einer intakten Nervenversorgung. Dieser kommt jedoch für die Form des Ödemablaufes eine beträchtliche Bedeutung zu. Die beschleunigte Ödemausbildung in innervierten Pfoten könnte dabei am ehesten als Auswirkung eines Axonreflexes aufgefaßt werden; eine Beeinflussung der terminalen Strombahn, die sich besonders in einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität nach Denervierung zeigt, könnte dagegen die nervösen Wirkungen nicht befriedigend interpretieren. Auch konnten wir in denervierten Rattenpfoten eine derartige Permeabilitätssteigerung — etwa in Form eines Spontanödems, wie es Schönbach (1958) am denervierten Kaninchenohr beschreibt —, nie feststellen.

Nervöse und humorale Mechanismen modifizieren demnach den Schwellungsablauf des Formolödems in charakteristischer Weise. Eine intakte Nervenversorgung bedingt anfangs in gleicher Weise bei Tieren mit und ohne Nebennieren eine Beschleunigung der Ödembildung, später bewirkt sie bei Tieren mit Nebennieren eine geringere Schwellungsintensität (niedrigeres Maximum) und eine früher einsetzende Schwellungsabnahme, bei Tieren ohne Nebennieren dagegen eine stärkere Schwellungsintensität. — Die Gegenwart der Nebennieren beeinflußt in den Anfangsstadien den Entzündungsprozeß in innervierten und denervierten Pfoten prinzipiell gleich: sie verzögert die Schwellungsausbildung; später jedoch ist ihre Wirkung in innervierten und denervierten Pfoten verschieden: in innervierten Pfoten bedingt sie eine geringere Schwellungsintensität (niedrigeres Maximum), in denervierten dagegen eine Verstärkung und eine später einsetzende Schwellungsabnahme.

Die den Entzündungsablauf modifizierenden nervösen und humoralen Faktoren wirken demnach zu Beginn der Entzündung völlig unabhängig voneinander und entgegengesetzt, später zeigen sie in ihrer Wirkungsweise eine gegenseitige Abhängigkeit, derart, daß der Schwellungsprozeß bei Vorhandensein nur eines der beiden Faktoren verstärkt, bei Gegenwart beider wie auch beim Fehlen beider jedoch abgeschwächt wird.

Dieses Verhalten könnte damit erklärt werden, daß bei einer Entzündung innervierte und denervierte Gewebe zunächst auf Nebennieren-Einflüsse prinzipiell gleich ansprechen, später jedoch nur das durch die Auswirkung nervöser Mechanismen „veränderte" Gewebe auf den hemmenden Einfluß der Nebennieren reagiert. Eine intakte Nervenversorgung wäre demnach eine Bedingung für ein derartiges Wirksamwerden der Nebennieren, deren Gegenwart ihrerseits Voraussetzung dafür ist, daß nervöse Einflüsse eine die maximale Intensität der Schwellung beschränkende und die Schwellungsabnahme beschleunigende Wirkung ausüben.

Einer *nervösen Übermittlung*, die nach Theobald (1955) für die Hemmung des Formolödems bei Rückenmarkdurchschneidung und nach Haas (1958) in gewissen Fällen für die Stimulierung der Nebennieren verantwortlich ist, kommt dabei — d. h. soweit sie in ihrer Auswirkung den lokalen Schwellungsprozeß betrifft — keine Bedeutung zu. Sonst könnten sich bei Tieren mit Nebennieren die durch eine Denervierung bedingten Veränderungen des Schwellungsablaufes in dem Versuch mit einseitiger Ödemerzeugung (vgl. in Abb. 2 den Schwellungsverlauf bei den Tieren der Gruppe 3 und der Gruppe 4 miteinander) nicht in der gleichen Weise zeigen wie in denen mit beidseitiger Ödemerzeugung (vgl. in Abb. 1 den Schwellungsverlauf in den innervierten und denervierten Pfoten bei den Tieren der Gruppe 1); bei den Tieren der Gruppe 1 müßte sich die — durch die Formolinjektion in die innervierte Pfote bewirkte — nervale Stimulierung der Nebennieren auf innervierte und denervierte Pfoten auswirken, bei einseitiger Ödemerzeugung nur auf die innervierten Pfoten der Tiere von Gruppe 3, nicht jedoch auf die denervierten Pfoten der Tiere von Gruppe 4.

Für die Stimulierung der Nebennieren, soweit sie sich auf den lokalen Schwellungsprozeß auswirkt, ist auch bedeutungslos, ob eine Entzündung nur in einer Pfote oder gleichzeitig in beiden Pfoten eines Tieres erzeugt wird, da die Wirkung der Nebennieren-Einflüsse in beiden Fällen — quantitativ — die gleiche ist.

Dieser Umstand hat jedoch eine Bedeutung für den Ödemablauf. Domenjoz, Theobald und Mörsdorf (1955) berichteten, daß sowohl das Dextran- als auch das Formolödem dann geringer ausgebildet sind, wenn sie gleichzeitig bei einem Tier erzeugt werden. Diesen Befund bestätigen unsere Versuchsergebnisse, soweit sie Tiere mit Nebennieren betreffen: die Schwellung einer Pfote erfährt eine Verzögerung ihrer Ausbildung und eine Hemmung ihrer maximalen Intensität durch ein gleichzeitig in der anderen Pfote erzeugtes Ödem. Diese Beeinflussung ist völlig unabhängig von der Art dieses Ödems — wovon wir uns in Versuchen, die nicht in den Rahmen dieser Arbeit fallen, überzeugen konnten — und von der Intaktheit der Nervenversorgung in beiden Pfoten. Für die anfängliche Verzögerung der Schwellungsausbildung ist auch die Gegenwart der Nebennieren bedeutungslos, die spätere Hemmung der maximalen Intensität ist jedoch an ihr Erhaltensein gebunden.

Zusammenfassung

1. Das Auftreten des Formolödems der Rattenpfote an sich ist weitgehend unabhängig von der Gegenwart der Nebennieren sowie einer intakten Nervenversorgung der Pfote.

2. Nervöse und Nebennieren-Einflüsse modifizieren jedoch den Schwellungsablauf des Formolödems in charakteristischer Weise, wobei

sie anfangs voneinander unabhängig wirken, später jedoch eine gegenseitige Abhängigkeit zeigen: a) Anfangs bedingt eine intakte Nervenversorgung wahrscheinlich auf dem Wege eines Axonreflexes, völlig unabhängig von den Nebennieren, eine Beschleunigung der Ödemausbildung und die Gegenwart der Nebennieren eine Verzögerung in innervierten und denervierten Pfoten. b) Später hat eine intakte Nervenversorgung nur bei Tieren mit Nebennieren eine die maximale Intensität der Schwellung beschränkende und die Schwellungsabnahme beschleunigende Wirkung; diese Wirkung ist eine unmittelbare und kommt nicht durch eine Stimulierung der Nebennieren auf nervalem Wege zustande. Darüber hinaus ist eine intakte Nervenversorgung auch eine Bedingung dafür, daß sich die Nebennieren-Einflüsse auf den lokalen Schwellungsprozeß in hemmendem Sinn auswirken.

Literatur

Bruce, A. N.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **63**, 424 (1910).
Cohnheim, J.: Virchows Arch. **40**, 1 (1867).
Domenjoz, R., W. Theobald u. K. Mörsdorf: Arzneimittel-Forsch. **5**, 488 (1955).
Florey, H.: Lectures on general pathology. London 1958.
Haas, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 544 (1958).
Halpern, B. N., et M. Briot: Arch. int. Pharmacodyn. **82**, 247 (1950).
Heilmeyer, L., J. Frey u. R. Fischer: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **214**, 416 (1952).
Henle, J.: Handbuch der rationellen Pathologie. Braunschweig 1846.
Hertting, G., u. E. Stoklaska: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 562 (1957).
Inutsuka, N.: Trans. Soc. path. jap. **18**, 341 (1928).
Lembeck, F.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 50 (1953).
Lewis, T., and R. T. Grant: Heart **11**, 209 (1924).
Marquardt, P., H. J. Meyer u. H. Schumacher: Arzneimittel-Forsch. **7**, 457 (1957).
Meltzer, S. J., and C. Meltzer: Amer. J. Physiol. **9**, 57 (1903).
Recklinghausen, F. v.: Handbuch der allg. Pathologie des Kreislaufes und der Ernährung. In Deutsche Chirurgie, Liefg. 2 u. 3. 1883.
Ricker, G.: Virchows Arch. **237**, 281 (1922).
Riechert, W., u. H. Klein: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **213**, 425 (1951).
Samuel, S.: Virchows Arch. **121**, 396 (1890).
Scheiffarth, F., u. G. Berg: Arzneimittel-Forsch. **2**, 304 (1952).
Schönbach, G.: Acta neuroveg. (Wien) **17**, 18 (1958).
Spiess, G.: Münch. med. Wschr. **8**, 345 (1906).
Theobald, W.: Arch. int. Pharmacodyn. **102**, 33 (1955).
Theobald, W., u. R. Domenjoz: Arch. int. Pharmacodyn. **104**, 453 (1955).
Wooley, P. Cr.: Zbl. allg. Path. path. Anat. **26**, 217 (1915).

Dr. G. Hertting, Pharmakologisches Institut der Universität, Wien/Österreich, Währingerstr. 13a

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 400—403 (1958)

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Zur Frage der Bedeutung der Lactatakkumulation für die Glucoseresorption

Von

K. Pfleger, H. Jacobi und W. Rummel

(Eingegangen am 2. Juni 1958)

Beim Transport von Glucose durch die Darmwand wurde eine gleichzeitige Anhäufung von Milchsäure auf der Serosaseite beobachtet. Damit lag die Vermutung nahe, daß diese Akkumulation von Lactat beim Glucosetransport eine Rolle spielt[9,10,12]. Trifft das zu, dann sollte diese Akkumulation von Lactat ausbleiben, wenn keine Glucose durch die Darmwand transportiert wird. Zur Klärung dieser Frage wurde die Lactatverteilung zwischen Mucosa- und Serosaseite am isolierten Darm unter der Einwirkung von Stoffwechselinhibitoren, die den Glucosetransport hemmen, bestimmt.

Methode

Isolierter Dünndarm (Jejunum) vom Meerschweinchen in der Durchströmungsapparatur nach Fisher u. Parsons[4]. Allgemeine Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit: 8,0 NaCl; 1,0 $NaHCO_3$; 0,2 $CaCl_2$; 0,1 $MgCl_2$; 0,2 KCl; g/1000 ml, dazu 50 μg Terramycin (Pfizer)/ml. Volumen auf der Mucosaseite 67 ml, auf der Serosaseite 50 ml. Durchströmungsflüssigkeit für die Mucosaseite zusätzlich 3,0 g Glucose und 9,24 ml isotonischer Phosphatpuffer p_H 7 auf 1000 ml[8]. Der Gasdurchstrom betrug etwa 3 l/min, dabei wurden rund 75 ml Suspensionsflüssigkeit je Minute transportiert. — Hydrostatischer Druck der Innenflüssigkeit 20 cm H_2O.

Milchsäurebestimmung nach Barker u. Summerson[2].

Ergebnisse und Diskussion

Vergleicht man die Höhe der Milchsäurebildung je Milligramm Trokkengewicht und Stunde unserer Kontrollen (Tabelle) mit den von Wilson[12,13] und Newey, Smyth u. Whaler[9] angegebenen Werten, so fällt auf, daß in unsern Versuchen die Milchsäurebildung 10 bis 20mal kleiner ist. Nur zum Teil kann diese Differenz artbedingt sein, denn auch im Vergleich zu den für Meerschweinchen angegebenen Zahlen von Dickens u. Weilmalherbe (zit. bei[13]) liegen unsere Werte rund 5mal niedriger. Wir führen diesen Unterschied auf die Versuchsanordnung zurück.

Während die genannten Autoren Darmabschnitte von über 60 cm Länge in ihren Versuchen verwenden, benutzten wir Darmabschnitte von

10 cm Länge, womit eine schnellere Durchströmung und bessere Sauerstoffversorgung erzielt werden kann. Außerdem ist bei unserer Versuchsanordnung dafür gesorgt, daß bis zu dem Moment, in dem die O_2-Durchströmung beginnt, die Durchblutung intakt bleibt.

In diesem Zusammenhang möchten wir auf eine neuere Arbeit von O. Warburg[11] hinweisen, die zeigt, daß die Höhe der aeroben Milchsäurebildung ein Ausdruck der Gewebsschädigung ist und daß unter optimalen Bedingungen die Glykolyse minimal ist. Bei zahlreichen Versuchen mit isolierten Därmen hat man die Darmstücke umgestülpt, was kaum ohne Irritation oder Läsion der Mucosa abgelaufen sein dürfte.

Eine weitere Ursache für eine erhöhte Lactatbildung ist eine bei Versuchen mit isoliertem Darm unvermeidliche Verunreinigung mit Bakterien[5]. Wir setzten deshalb in unsern Versuchen 50 μg Terramycin je Milliliter Nährlösung zu.

Eine Akkumulation von Milchsäure ließ sich auch unter unseren Bedingungen auf der Serosaseite nachweisen, wenngleich bei wesentlich geringerer Gesamtproduktion. Wie die Kontrollen (Tabelle) zeigen, ist mehr als doppelt soviel Milchsäure auf der Serosaseite als auf der Mucosaseite vorhanden. Infolge des verhältnismäßig großen Volumens an Flüssigkeit auf der Serosaseite kommt es dort zu einer starken Verdünnung der Milchsäure. Um die tatsächliche Lactatkonzentration in der extracellulären Flüssigkeit auf der Serosaseite des Darmes zu bestimmen, haben wir in einer besonderen Versuchsgruppe die Außenflüssigkeit auf der Serosaseite weggelassen. (Es wurden Vorkehrungen getroffen, eine künstliche Konzentrierung oder Verdünnung durch Verdunstung bzw. Kondensation zu verhindern.) Im Verlaufe von 1 Std tropfen 0,1—0,2 ml Flüssigkeit ab. Für diese Flüssigkeit kann man annehmen, daß ihre Zusammensetzung der Flüssigkeit im Extracellulärraum entspricht. Wir fanden hierbei in 4 Versuchen eine Milchsäurekonzentration von 7,5 bis 11,7 mg je 100 ml. Sie liegt in derselben Höhe wie die Lactatkonzentration im Blut. Das Flüssigkeitsvolumen, mit dem die Mucosaseite in diesen Versuchen bespült wurde, betrug 67 ml. Unter diesen willkürlich gewählten Bedingungen fanden wir in der Innenflüssigkeit (Mucosaseite) 0,1 $\pm$ 0,04 mg Lactat je 100 ml. Es stellte sich also hierbei zwischen Mucosaseite und Extracellularraum auf der Serosaseite ein Konzentrationsverhältnis von 1 : 100 ein. (Unter Dinitrophenol fanden wir eine Lactatkonzentration in der abtropfenden Flüssigkeit von rund 90 mg pro 100 ml. Da unter DNP auch die Milchsäurekonzentration in der Innenflüssigkeit 10 mal höher ist, entspricht auch unter DNP der Gradient einem Verhältnis von 1 : 100.)

Trotz diesem steilen Gradienten beträgt die außen angehäufte Lactatmenge nur den 20. Teil der gleichzeitig transportierten Glucose (siehe nachfolgende Mitteilung). Atkinson, Parsons u. Smyth[1] haben mit radioaktiver Glucose in vivo etwa das gleiche Verhältnis nachgewiesen. Bei unseren Kontrollen (Tabelle) werden in der Stunde 2,47 μg Lactat je

Milligramm Trockengewicht und Stunde außen angehäuft, und gleichzeitig treten 61 μg Glucose [6] zur Serosaseite durch.

Unter Dinitrophenol (DNP) und anaeroben Bedingungen (N_2) ist die Gesamtmilchsäurebildung 5—10mal höher. Auch dabei kommt es unter DNP zu einer deutlichen Anhäufung auf der Serosaseite (siehe Tabelle), die unter N_2 hier vielleicht infolge der geringen Versuchszahl nicht eindeutig ist; denn bei 13 weiteren in anderem Zusammenhang unter N_2

Tabelle

Lactat in µg/mg Trockengewicht und Stunde bei 37° C

	K		N_2		DNP 10^{-4}		MJE 10^{-3}		MJE 10^{-3} + DNP 10^{-4}		NaF $5 \cdot 10^{-3}$		NaF $5 \cdot 10^{-3}$ + DNP 10^{-4}	
	i	a	i	a	i	a	i	a	i	a	i	a	i	a
	0,9	2,0	13,8	18,5	8,9	11,8	3,9	2,7	4,8	2,6	3,8	3,6	5,7	7,4
	0,2	1,3	14,4	15,0	8,4	10,5	3,7	3,8	3,7	2,3	3,7	4,4	5,5	7,6
	1,2	2,7	18,8	15,8	5,9	10,3	1,5	1,8	3,1	3,0	2,4	3,2	3,8	5,7
	1,4	4,2	15,4	16,5	8,7	11,4	1,9	2,0	1,9	2,0	5,4	5,7	5,8	9,2
	1,2	2,6			4,4	7,2			1,6	1,7			5,5	9,0
	0,8	2,0							4,2	3,8			4,9	8,2
													7,8	9,8
													5,8	7,0
M =	0,9	2,5	15,6	16,5	7,3	10,2	2,7	2,6	3,2	2,6	3,7	4,2	5,6	8,0
i+a =	3,4		32,1		17,5		5,3		5,8		7,9		13,6	
10^{-2} µmol =	3,8		35,6		19,5		5,9		6,4		8,8		15,1	

i = Mucosaseite, a = Serosaseite, K = Kontrollen.

durchgeführten Versuchen, die sich nur darin unterschieden, daß sich außer auf der Mucosa- noch auf der Serosaseite Glucose befand, kommt diese Anhäufung auch unter anaeroben Bedingungen deutlich heraus. Es fanden sich dabei auf der Serosaseite 60% mehr Lactat als auf der Mucosaseite. Unter DNP und unter anaeroben Bedingungen wird also ebenfalls Lactat auf der Serosaseite angehäuft, obwohl in beiden Fällen keine Glucose mehr durch die Darmwand transportiert wird [3,6], d.h. aber, ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Glucosetransport und Lactatanhäufung besteht nicht.

Unter Monojodessigsäure (MJE) und Natriumfluorid (NaF) hingegen, die zwar den Glucosetransport ebenfalls hemmen, wenngleich wesentlich schwächer als DNP ([7] und nachfolgende Mitteilung), unterbleibt die Anhäufung von Lactat bei MJE völlig und ist bei NaF fraglich (siehe Tabelle). MJE verhindert auch die unter DNP bei höherer Gesamtproduktion von Lactat auftretende Akkumulation auf der Serosaseite. Die durch DNP gesteigerte Glycolyse wird dabei um zwei Drittel reduziert, d.h. auf die Höhe ,die der Lactatbildung unter MJE allein entspricht. Da bei

gleichzeitiger Einwirkung von MJE und DNP der durch DNP gehemmte Glucosetransport aber bis zu einem gewissen Grade reaktiviert wird ([7] und nachfolgende Mitteilung) und Lactat dabei nicht angehäuft wird, zeigt sich auch hier, daß keine Beziehung zwischen Lactatakkumulation und Glucosetransport besteht. — NaF unterscheidet sich von MJE, es hemmt die durch DNP gesteigerte Glykolyse schwächer als MJE (möglicherweise ist die unterschiedliche Penetrationsfähigkeit ein Grund dafür). Auch tritt die unter DNP beobachtete Lactatakkumulation bei gleichzeitiger Einwirkung von NaF noch in Erscheinung, obwohl die gesteigerte Lactatbildung deutlich gehemmt wird. Da auch NaF den durch DNP gehemmten Glucosetransport reaktiviert[7], wobei im Gegensatz zu den Versuchen mit MJE Lactat akkumuliert, ergibt sich, daß Lactatakkumulation und Glucosetransport zwar parallel gehen können, aber dennoch nicht obligat miteinander verbunden sind.

Summary

1. In spite of the inhibition of glucose transport across the intestinal wall by DNP and by anaerobiosis, lactic acid accumulates on the serosal side.

2. Under normal conditions and in the presence of DNP, the lactic acid concentration of the extracellular fluid produced on the serosal side is 100 times higher than that of the luminal fluid.

3. Both iodoacetic acid and NaF reduce the DNP-activated glycolysis but only iodoacetic acid inhibits the accumulation of lactic acid on the serosal side.

4. Glucose transport is independet of lactic acid accumulation. Quantitatively considered, about 10 times more glucose is transported than is lactic acid accumulated.

Literatur

[1] Atkinson, R.M., B. J. Parsons and D.H.Smyth: J. Physiol. (Lond.) **135**, 581 (1957).
[2] Barker, S. B., and L. H. Summerson: J. biol. Chem. **138**, 535 (1941).
[3] Darlington, W. A., and J. H. Quastel: Arch. Biochem. **43**, 149 (1953).
[4] Fisher, R. B., and D. S. Parsons: J. Physiol. (Lond.) **110**, 36 (1949).
[5] Jacobi, H., K. Pfleger u. W. Rummel: unveröffentlichte Befunde.
[6] Jacobi, H., K. Pfleger u. W. Rummel: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 300 (1957).
[7] Jacobi, H., K. Pfleger u. W. Rummel: Verhandlung der Gesellschaft für Physiologische Chemie 1957 in Basel.
[8] Muralt v., A.: Praktische Physiologie S. 252 (1948).
[9] Newey, H., D. H. Smyth and B. C. Whaler: J. Physiol. (Lond.) **129**, 1 (1955).
[10] Smyth, D. H., and C. B. Taylor: J. Physiol. (Lond.) **136**, 632 (1957).
[11] Warburg, O.: Z. Naturforsch. **12** B, 115 (1957).
[12] Wilson, T. H.: Biochem. J. **56**, 521 (1954).
[13] Wilson, T. H.: J. biol. Chem. **222**, 751 (1956).

Prof. Dr. W. Rummel u. Dr. K. Pfleger, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstr. 5

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 404—413 (1958)

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Die Beziehungen zwischen Phosphatdurchtritt und Glucoseresorption *

Von
H. Jacobi, W. Rummel und K. Pfleger

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Juni 1958)

An Zellsuspensionen von Erythrocyten und Hefe ist die Phosphataufnahme eingehend untersucht (Lit. siehe [18]). Wenn auch der Mechanismus noch nicht geklärt ist, so kann doch so viel als gesichert gelten, daß es sich um einen vorwiegend fermentabhängigen Vorgang handelt.

Der Phosphatdurchtritt durch den Zellverband der Darmmucosa jedoch wird als Diffusionsvorgang angesehen (1937 Laskowski[8]; 1956 McHardy u. Parsons[11]; 1957 Smyth u. Taylor[19]). Dazu in Widerspruch steht die Annahme, daß der Phosphattransport durch die Zellmembran aufs engste mit dem Glucosetransport verknüpft sei (1956 Prankerd[14]), eine Anschauung, die sich im Einklang mit der Vorstellung von Wilbrandt u. Laszt[21] über die Rolle der Phosphorylierung für den Glucosetransport befindet.

Diese Untersuchungen sollen am isolierten Darm (nach Fisher u. Parsons[3]) zur Klärung dieses Widerspruchs beitragen.

Methode **

Einzelheiten über die Versuche mit der Durchströmungsapparatur nach Fisher u. Parsons[3] siehe vorausgehende Mitteilung und[17]. Histologische Kontrollen wurden am Versuchsende durchgeführt und ergaben im Vergleich zu frisch entnommenen Därmen leichte Epitheldesquamationen, möglicherweise erst arteficiell infolge der Auflockerung des interstitiellen Gewebes entstanden (siehe auch[1]). Die funktionelle Intaktheit der Mucosa geht schon aus den Versuchen von Gibson u. Wismann[4] über die bevorzugte Resorption von l-Aminosäuren durch isolierte Därme hervor. Selbst unter anaeroben Bedingungen beträgt in Gegenwart von Glucose die Überlebenszeit von Magenschleimhaut 2—3 Std[10].

Phosphatdurchtritt bestimmt mit P^{32} (40 μC zur Innen- bzw. Außenflüssigkeit), Aktivität in 1 ml gemessen. Versuchsdauer 2 Std (die angegebenen Werte sind auf

* Über die Befunde wurde bei der Tagung der Pharmakologischen Gesellschaft in Freiburg und bei der Tagung der Gesellschaft für Physiologische Chemie in Basel 1957 vorgetragen.

** Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Überlassung des Strahlungsmeßgerätes.

1 Std umgerechnet). Feuchte Veraschung zur Bestimmung des P^{32} im Darmgewebe. — Bei Versuchen ohne Außenflüssigkeit: wiegen der auf der Serosaseite abgetropften Flüssigkeit, danach verdünnen zur Bestimmung von Aktivität und Glucose[12] bzw. gesamtem anorganischem Phosphat nach Weil-Malherbe[20], Messung der Absorption des Phosphormolybdatkomplexes ohne vorherige Reduction bei 310 mμ.

Temperaturabhängigkeit an 3 Durchströmungsapparaten zugleich geprüft. Kontrollen und Versuchsansätze mit Darmstücken von einem Tier (Jejunum). — In Versuchen mit NaF : Tyrode ohne $MgCl_2$.

Ergebnisse

Zunächst wurde die *Temperaturabhängigkeit* des P^{32}-*Durchtritts* von der Mucosa- nach der Serosaseite (i→a) geprüft, um zu entscheiden, ob es sich dabei um einen *Diffusionsvorgang* handelt. Die Abhängigkeit von der Temperatur erwies sich als sehr hoch, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (Abb. 1).

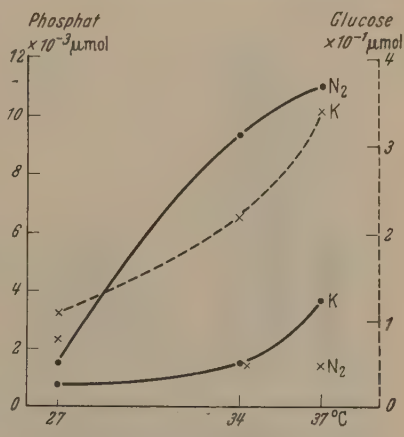


Abb. 1. Temperaturabhängigkeit von Phosphat und Glucosedurchtritt (× 10^{-3} bzw. 10^{-1} μ mol pro mg Tgw. und Std), •—• *K:* P-Durchtritt, Kontrolle, •—• N_2*:* P-Durchtritt, anaerob, × - - × *K:* Glucosedurchtritt, Kontrolle, ×× N_2*:* Glucosedurchtritt, anaerob.

P-Durchtritt

K	37° =	3,7 ± 1,6	n = 19
	34° =	1,7 ± 1,1	n = 12
	27° =	0,7 ± 0,3	n = 10
N_2	37° =	11,0 ± 4,7	n = 8
	34° =	9,5 ± 5,0	n = 9
	27° =	1,3 ± 0,8	n = 8

Glucose-Durchtritt

K	37° =	3,4 ± 1,1	n = 7
	34° =	2,2 ± 0,6	n = 7
	27° =	1,1 ± 0,4	n = 7
N_2	37° =	0,5 ± 0,3	n = 8
	34° =	0,5 ± 0,2	n = 8
	27° =	0,8 ± 0,1	n = 8

Zwischen 37° C und 34° C ist unter oxydativen Bedingungen die Abnahme steiler und unter anoxydativen viel flacher als der Theorie nach zu erwarten. Streng genommen dürfte man demnach die Temperaturabhängigkeit nicht durch den Q_{10} ausdrücken. Gibt man trotzdem den Q_{10} wie üblich als den Faktor an, um den der Durchtritt bei 37° höher liegt als bei 27° C, dann beträgt er für aerobe Verhältnisse 5,3 und für anaerobe 8,5. (Der Q_{10} des P^{32}-Durchtritts unter Dinitrophenol (DNP) betrug 6,6[13]. Auffällig ist, daß der Verlauf des Phosphatdurchtritts mit der Temperatur unter anaeroben Bedingungen dem der anaeroben Glykolyse gleicht[17], d. h., daß zwischen 37° C und 34° C sowohl die glykolytische Aktivität des Darmes als auch der Phosphatdurchtritt durch die Darmwand nur überraschend wenig abnimmt. — Der unter denselben Bedingungen vergleichsweise für Rhodanid bestimmte Q_{10} beträgt 1,7 (37° C = 4,1 μg/mg Tgw/Std. n = 8; 27° C = 2,4 μg/mg Tgw/Std. n = 5). Im Gegensatz zu Phosphat tritt anaerob nicht mehr

durch als aerob, (genau so unter DNP), d. h. die Durchlässigkeit der Membran hat sich unter O_2-Mangel nicht geändert.

Der Phosphatdurchtritt ist also weit stärker temperaturabhängig als der eines diffundierenden Anions. Unter anaeroben Bedingungen tritt rund 3mal soviel Phosphat durch die Darmwand als unter aeroben.

Die *Glucoseresorption* unterscheidet sich in ihrer Temperaturabhängigkeit von der Phosphatresorption mit einem Q_{10} von 3 (Abb. 1) und kommt im Gegensatz zum Phosphattransport unter anaeroben Bedingungen zum Stillstand (siehe auch[1]).

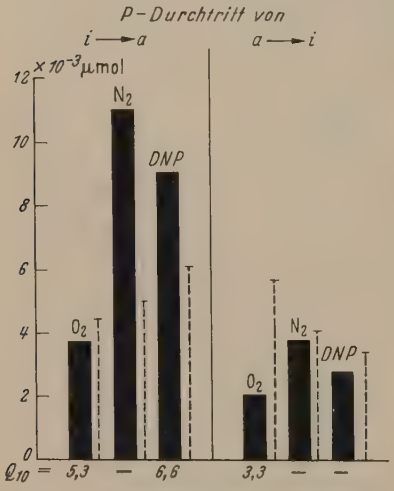


Abb. 2. Abhängigkeit des Phosphatdurchtritts von der Richtung ($\times 10^{-3}$ µmol pro mg Tgw. und Std). Die gestrichelten Säulen geben die P-Aufnahme in die Darmwand an

Durchtritt i→a

K	=	3,7 ± 1,6	n = 19
N_2	=	11,0 ± 4,7	n = 8
DNP	=	9,1 ± 4,7	n = 17

Durchtritt a→i

K	=	2,0 ± 1,1	n = 6
N_2	=	3,7 ± 0,4	n = 4
DNP	=	2,7 ± 1,7	n = 4

Aufnahme bei i→a

K	=	4,4 ± 0,5	n = 7
N_2	=	5,2 ± 1,7	n = 5
DNP	=	6,1 ± 1,8	n = 10

Aufnahme bei a→i

K	=	5,6 ± 0,6	n = 4
N_2	=	4,0 ± 0,5	n = 4
DNP	=	3,4 ± 1,4	n = 4

Die *Bevorzugung einer Richtung* ist charakteristisch für einen Resorptionsvorgang (Abb. 2). Deshalb wurde zum Vergleich auch die P^{32}-Durchtrittsrate in der umgekehrten Richtung, d. h. von der Serosaseite zur Mucosaseite (a→i) geprüft und gleichzeitig die in die Darmwand aufgenommene Menge bestimmt. Wenn man der Ringer-Lösung nur auf der Serosaseite Phosphat und Glucose zusetzt, dann beträgt die nach der Mucosaseite durchgetretene Phosphatmenge $^1/_2$—$^1/_3$ der in umgekehrter Richtung resorbierten Menge (in diesem Fall war Phosphat und Glucose der Ringer-Lösung nur auf der Mucosaseite zugesetzt worden).— Der Q_{10} für den Phosphatdurchtritt von der Serosa- zur Mucosaseite liegt viel niedriger und beträgt bei den Kontrollen 3,3 im Vergleich zu 5,3 für die Passage in der umgekehrten, normalen Richtung.

Die hingegen *in die Darmwand* aufgenommene Phosphatmenge unterscheidet sich nicht charakteristisch in Abhängigkeit von der Seite, auf die das P^{32} gegeben wurde. Unter anaeroben Bedingungen wie unter DNP, das ebenfalls die Glykolyse beträchtlich steigert (siehe vorangehende Mitteilung), steht dem gesteigerten Durchtritt (i→a) keine im gleichen Maße erhöhte Aufnahme in die Darmwand gegenüber.

Trotz etwa gleicher Aufnahme von Phosphat in die Darmwand beim Durchtritt in beiden Richtungen penetriert also 2—3mal soviel Phosphat von i→a als umgekehrt. Auch die Temperaturabhängigkeit des Durchtritts ist für beide Richtungen verschieden, d. h. für die Richtung i→a beträchtlich höher.

Für eine weitere Kennzeichnung der Phosphatresorption ist wichtig zu wissen, ob die *Phosphatkonzentration im extracellurälen* Raum auf der Serosaseite gleich oder höher ist, verglichen mit der Suspensionsflüssigkeit, mit der die Mucosa bespült wird. Zu diesem Zweck wurde das Darmstück nur auf der Innenseite (Mucosa) mit phosphat- und glucosehaltiger

Tabelle

Konzentrationsdifferenz zwischen Mucosa- (i) und Serosaseite (a) nach 1 Std in mg/100 ml

P-Konzentration zu Beginn innen 3,98 mg pro 100 ml; Glucose 300 mg pro 100 ml

		i	a	durchgetr. Menge	abgegeb. Flüssigkeit in 10^{-3} ml/mg Tgw.
Kontrolle	anorg. P	*3,5* ± 0,2 n = 8*	*5,6* ± 1,2 n = 9*	*1,1* ± 0,5 n = 10**	*2,72* ± 0,8 n = 9
	Glucose	*261* ± 7,8 n = 9	*487* ± 111 n = 9	—	
DNP 10^{-4}mol	anorg. P	*3,5* ± 0,4 n = 10*	*5,2* ± 1,0 n = 10*	*2,2* ± 0,6 n = 10**	*1,44* ± 0,6 n = 10
	Glucose	*262* ± 11,8 n = 7	*115* ± 48,6 n = 7	—	

* spektrophotometrisch bestimmt.
** mit P^{32} bestimmt.

Ringer-Lösung durchströmt und in der außen von der Serosa abtropfenden Lösung die Phosphat- und auch Glucosekonzentration bestimmt. (Es waren Vorkehrungen getroffen, daß weder durch Verdunstung noch durch Kondensation die ursprüngliche Konzentration eine Änderung erfährt.) Die auf der Serosaseite austretende Flüssigkeit dürfte in ihrer Zusammensetzung der Extracellularflüssigkeit entsprechen.

Wie die Tabelle zeigt, ist die *Phosphat- wie die Glucosekonzentration in der Extracellulärenflüssigkeit höher als in der Suspensionslösung auf der Mucosaseite, und zwar rund 1,5 bzw. 1,8mal. Mit anderen Worten, auch Phosphat tritt, wie Glucose, entgegen einem Konzentrationsgradienten durch die Mucosa.*

Vergleicht man die Verhältnisse unter DNP, dann zeigt sich, daß der Konzentrationsgradient zwischen Serosa- und Mucosaseite für Phosphat noch erhalten bleibt, aber nicht mehr für Glucose (siehe Tabelle). Das

entspricht der Tatsache, daß zwar der Glucosetransport weitgehend gehemmt ist, nicht aber der Phosphatdurchtritt. Unter DNP wird jedoch nur etwa die halbe Menge an Flüssigkeit produziert (siehe auch[11]). Die Konzentration des gesamten anorganischen Phosphat bleibt dabei gleich hoch. Der Anteil jedoch, den das durchgetretene, markierte Phosphat daran hat, liegt aber etwa doppelt so hoch. Bei dieser Versuchsanordnung ist also nur relativ — d.h. gemessen an der spezifischen Aktivität — mehr Phosphat durchgetreten. Bespült man aber in einer anderen Versuchsanordnung die Serosa mit phosphatfreier Lösung und hält das Außenvolumen so groß, daß die Produktion unterschiedlicher Flüssigkeitsmengen prozentual nicht ins Gewicht fällt, dann zeigt sich, daß auch absolut gesehen, d. h. bezogen auf das Trockengewicht unter DNP und N_2 3mal mehr Phosphat von i→a durch die Darmwand tritt (Abb. 2).

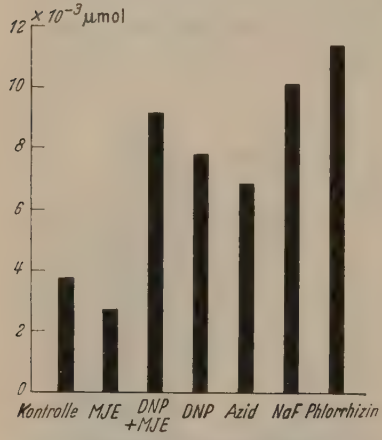


Abb. 3. Einfluß von Stoffwechselgiften auf den Phosphatdurchtritt (× 10^{-3} µmol pro mg Tgw. und Std).

K		= 3,7 ± 1,6	n =	19
MJE	10^{-3} m	= 2,6 ± 0,7	n =	3
DNP	10^{-4} m	= 9,1 ± 4,7	n =	17
DNP + MJE		= 7,8 ± 2,0	n =	4
Azid	$2 \cdot 10^{-3}$ m	= 6,8 ± 3,9	n =	6
NaF	$5 \cdot 10^{-3}$ m	= 10,0 ± 2,8	n =	4
Phlorrhizin	10^{-2} m	= 11,3 ± 5,4	n =	5

Da die bisherigen Resultate einen deutlichen Zusammenhang zwischen Phosphatdurchtritt und Stoffwechsel ergaben, waren weitere Aufschlüsse durch die Anwendung von *Inhibitoren* zu erwarten. Der *erhöhte Phosphatdurchtritt* geht nach den vorigen Befunden mit einer — ob anaerob unter N_2 oder aerob unter DNP — *gesteigerten Glykolyse* einher.

Das war der Anlaß, weshalb zunächst der Einfluß der Glykolysegifte, *Monojodessigsäure* (MJE) und *Natriumfluorid* (NaF) auf den Phosphattransport geprüft wurde (Abb. 3). Es ergab sich, daß MJE die normale Phosphatdurchtrittsrate unverändert ließ und NaF überraschenderweise den Durchtritt sogar beträchtlich steigerte. Allerdings stellte sich heraus, daß beide Stoffe in den angewendeten Konzentrationen die minimale glykolytische Aktivität unserer Präparate nicht weiter herabzusetzen vermögen (siehe vorangegangene Mitteilung), so daß also diese Ergebnisse zur Beantwortung der ursprünglichen Frage nicht brauchbar waren. Darum wurde der Einfluß der MJE auf den Phosphattransport noch einmal unter gleichzeitigem Einfluß von DNP geprüft. Dabei senkte die MJE zwar die durch DNP gesteigerte aerobe Glykolyse fast bis auf normale Werte (siehe vorangegangene Mitteilung), aber ohne gleichzeitig den erhöhten P-Durchtritt zu vermindern.

Eine Steigerung der Glykolyse kommt also nicht als alleiniger, ursächlicher Faktor für eine Steigerung des Phosphatdurchtritts in Frage. Das geht auch schon daraus hervor, daß NaF merkwürdigerweise den Phosphatdurchtritt erhöht.

NaF ist aber gleichzeitig auch ein *Phosphataseinhibitor*. Da die intestinale Mucosa besonders reich an alkalischer Phosphatase ist und diese Fermentgruppe möglicherweise auf eine noch unbekannte Art einen Einfluß auf die Phosphatresorption hat, wurde die Wirkung von *Azid* und *Phlorrhizin*, von 2 weiteren bekannten Phosphatasehemmstoffen geprüft[15]. In beiden Fällen *nimmt die Phosphatresorption sehr stark zu*, unter Phlorrhizin beträgt sie das 3fache der Norm (Abb. 3). Atmung und Glykolyse werden in der hier verwendeten, hohen Phlorrhizinkonzentration von 10^{-2} mol (bleibt nicht vollständig in Lösung) nicht verändert, wie wir an Darmstückchen in der Warburg- bzw. der Durchströmungsapparatur nachkontrolliert haben.

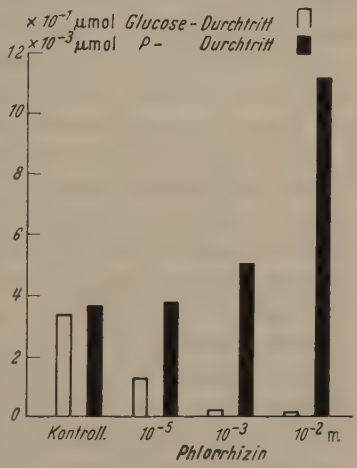


Abb. 4. Einfluß von Phlorrhizin auf Phosphat- und Glucosedurchtritt ($\times 10^{-3}$ bzw. 10^{-1} µ mol pro mg Tgw. und Std).

P-Durchtritt

K	= 3,7 ± 1,6	n =	19
Phlorrhizin 10^{-5}	= 3,8 ± 1,4	n =	4
Phlorrhizin 10^{-3}	= 5,1 ± 1,5	n =	5
Phlorrhizin 10^{-2}	= 11,3 ± 5,4	n =	5

Glucose-Durchtritt

K	= 3,4 ± 1,1	n =	7
Phlorrhizin 10^{-5}	= 1,3 ± 0,4	n =	5
Phlorrhizin 10^{-3}	= <0,6	n =	5

In Zusammenhang mit dieser Zunahme der Phosphatresorption unter Phlorrhizin und der bekannten Hemmung der Glucoseresorption interessierte die Frage, ob die Hemmstoffkonzentration für beide Effekte gleich ist. Da durch histochemische Bestimmungen für den Darm bekannt ist, bei welchen Phlorrhizinkonzentrationen die Phosphatasen blockiert sind[9], mußte festgestellt werden, ob auch tatsächlich erst bei diesen Konzentrationen der Phosphatdurchtritt erhöht ist.

Zunächst ließ sich dabei auch in vitro zeigen —, was bisher nur am durchbluteten Präparat in vivo möglich schien —, daß die Phlorrhizinkonzentration, die den Glucosetransport blockiert, etwa $^1/_{1000}$ jener beträgt, die die Phosphatase hemmt[9]. Darüberhinaus ergab sich, daß die Phosphatresorption erst durch Phlorrhizinkonzentrationen gesteigert wird, die die Phosphatase weitgehend inaktivieren (Abb. 4).

Diskussion

Es war von Anfang an nicht sehr wahrscheinlich, daß der Phosphatdurchtritt durch die Darmwand vorwiegend ein einfacher Diffusionsvorgang sei. Das würde nämlich bedeuten, daß die Phosphataufnahme

des Organismus weitgehend vom Angebot abhinge. Nachdem für Erythrozyten und Hefezellen erwiesen ist, daß die Phosphataufnahme durch die Zellmembran von enzymatischen Prozessen abhängt[18], war dasselbe erst recht für den Darm zu erwarten. Die hohe Temperaturabhängigkeit (Abb. 1), die vor allem in Vergleich zu einem anderen Anion, Rhodanid, deutlich hervortritt, und die Beeinflußbarkeit durch Stoffwechselgifte (Abb. 4) zeigen auch für den Darm, daß der Phosphatdurchtritt ein stoffwechselabhängiger Vorgang ist.

Allerdings liegen am Darm die Verhältnisse insofern komplizierter, als es sich um einen transcellulären Transport[16] vom Darmlumen durch den Zellverband der Mucosa in den submukösen, extracellulären Raum handelt. Bei einer derartigen multicellulären Membran interessiert die Frage, ob Phosphat in einer Richtung bevorzugt durchtritt. Tatsächlich penetriert pro Stunde und Trockengewicht 2—3mal mehr von der Mucosa- nach der Serosaseite. Die Temperaturabhängigkeit des Durchtrittsvorgangs in dieser Richtung und auch die Zunahme der Durchtrittsrate unter N_2 und DNP sind beträchtlich höher als für die umgekehrte „unphysiologische" Richtung (Abb. 2).

Die Phosphatkonzentration im extracellulären Raum auf der Serosaseite lag über 5 mg P pro 100 ml nach 1 Std, das ist das 1,5fache der P-Konzentration auf der Mucosaseite bei unserer Versuchsanordnung und das Doppelte der P-Konzentration im Blut. Auch für Glucose stellt sich eine höhere Konzentration in der extracellulären Flüssigkeit ein[19]. Sie beträgt das 1,8fache der Konzentration im Darmlumen (siehe Tabelle). Das sind weitere Befunde, die gegen eine einfache Diffusion sprechen. Selbstverständlich ist durchaus möglich, daß, wie beim Erythrocyten ein Teil des Phosphats unabhängig vom Stoffwechsel diffundiert[6], was auch am Darm für Glucose zutrifft[2,22]. Daß die Diffusion aber unter normalen Bedingungen eine so bestimmende Rolle spielt, wie das nach den Befunden von McHardy u. Parsons[11] zu sein scheint, ist schon deswegen fragwürdig, weil bei diesen Versuchen die Calciumkonzentration 0 war und darüberhinaus der Calciumbestand der Membranen durch die hohen Phosphatkonzentrationen nicht unbeeinflußt geblieben sein kann. Es ist aber bekannt, daß Calcium auf die Durchlässigkeit von Zellmembranen, z. B. für Kalium[5], einen entscheidenden Einfluß besitzt.

Es erhebt sich die Frage nach dem Stoffwechselschritt, mit dem der Phosphattransport gekoppelt sein könnte. Da man annimmt, daß Phosphorylierungsprozesse bzw. neuerdings transphosphorylierende Funktionen von Phosphatasen mitwirken[16], lag die Vermutung nahe, daß auf diese Weise der Phosphattransport mit dem Glucosetransport eng gekoppelt sei[14]. Aber schon die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der beiden Vorgänge spricht dagegen (siehe Abb. 1). Darüberhinaus kann der Phosphatdurchtritt zunehmen, während die

Glucoseresorption gleich bleibt (z. B. unter Thyroxin[13]) oder sogar abnimmt bzw. völlig aufhört (z. B. unter Phlorrhizin, Abb. 5).

Drei Tatsachen sprechen dafür, daß der enzymabhängige Phosphatdurchtritt durch die Darmwand hauptsächlich mit dem anoxydativen Teil des Stoffwechsels gekoppelt ist: 1. Wenn die Atmung unterdrückt wird, nimmt der P-Durchtritt nicht ab, sondern bei gleichzeitig gesteigerter Glykolyse stark zu. 2. Auch wenn die oxydative Phosphorylierung durch DNP aufgehoben wird, nimmt der Phosphatdurchtritt wiederum nicht ab, sondern bei gleichzeitig gesteigerter aerober Glykolyse beträchtlich zu. 3. Die Temperaturabhängigkeit des Phosphatdruchtritts, die unter aeroben Verhältnissen zwischen 37° C und 34° C sehr steil ist, gleicht sich unter anaeroben Bedingungen dem Verhalten der Glykolyse darin an, daß zwischen 37° C und 34° C nur eine geringe Abnahme zu verzeichnen ist.

Ein Befund scheint allerdings hier zu widersprechen. Mit MJE ließ sich zwar die mit DNP erzeugte Glykolysesteigerung aufheben, aber nicht der erhöhte P-Durchtritt. Im Grunde könnte damit aber lediglich zum Ausdruck kommen, daß der Phosphatdurchtritt nicht mit der Lactatbildung als solcher verknüpft ist, sondern nur mit einem Teil des anoxydativen Stoffwechselabschnitts. Hierfür sprechen auch die Beobachtungen, daß NaF und Phlorrhizin als Phosphatasegifte den P-Durchtritt steigern, ohne dabei die Glykolyse zu beeinflussen.

Allein aus rein räumlichen Gründen kommen nur bestimmte Phosphorylierungsschritte für die Überführung von anorganischem P in organische Bindung in der luminalen Doppelmembran der Mucosazellen oder der unmittelbar darunterliegenden Schicht in Betracht. Die elektronenoptischen Untersuchungen von Zetterqvist[23] lassen folgende Schlußfolgerungen zu.

Die oxydative Phosphorylierung kann nicht unmittelbar mit dem beobachteten Phosphattransport zusammenhängen, denn gerade entlang des luminalen Teils der Zellmembran der Mucosazelle sind in größerem Abstand keine Mitochondrien zu finden. Es kommen also dort für die Überführung von P in organische Bindung nur Prozesse in Frage, deren Enzymsysteme in der Membran oder wenigstens im Zellplasma oder den Mikrosomen lokalisiert sind. Eine Klärung der Frage, welchem Phosphorylierungsschritt dabei die entscheidende Rolle zukommt, kann nur die Untersuchung der einzelnen Phosphatfraktionen unter verschiedenen Bedingungen bringen. Die Möglichkeit eines reinen, wenn auch enzymabhängigen, Austauschs zwischen anorganischem und organischem Phosphat sollte dabei nicht außer acht gelassen werden*.

* Zwischen anorganischem Phosphat und ATP ist ein derartiger Austausch beobachtet worden [M. A. Swanson, Biochim. et Biophys. Acta **20**, 85 (1956) und P. D. Boyer, W. H. Harrison, A. B. Falcone u. J. G. Gander, Fed. Proc. **13**, 185 (1954)]. Wir selbst haben an Kaninchenerythrocyten unter Bedingungen, unter denen keine Glykolyse stattfand, einen Austausch festgestellt (noch nicht veröffentlichte Befunde).

Weshalb aber läßt sich durch *Hemmung der Phosphatase* mit NaF, Azid und Phlorrhizin *der Phosphatdurchtritt steigern*? — Die alkalische Phosphatase, an der die intestinale Mucosa wie das andere für die Resorption wichtige Gewebe, die Tubulusepithelien*, sehr reich ist[15], kommt zum überwiegenden Teil im Zellplasma vor[7]. Wenn man annimmt, daß aus Gründen der Diffusion im luminalen Teil der Mucosazellen die Phosphatase durch die Inhibitoren sehr stark und im basalen Teil kaum oder gar nicht inaktiviert wird, dann läßt sich die Erscheinung folgendermaßen erklären. Die im luminalen Teil gebildete organische Phosphatverbindung (bzw. Verbindungen), die für den transcellulären Transport in Frage kommt, häuft sich als Folge der gehemmten Spaltung dort stärker an, so daß bei unverminderter Phosphataseaktivität an der basalen Membran ein steileres Konzentrationsgefälle die Ursache für eine höhere Durchtrittsrate wäre. Das ist aber nur eine Hypothese.

Summary

1. The dependence on temperature of phosphate penetration across the intestinal wall was higher ($Q_{10} = 5{,}3$) than for the diffusing rhodanid ($Q_{10} = 1{,}7$) and also higher than for the glucose transport ($Q_{10} = 3{,}0$).

2. The phosphate flux from the mucosal to the serosal side was 2 to 3 times higher than in the opposite direction wherease the phosphate uptake into the tissue was the same for both directions.

3. Under anaerobic conditions or DNP, the phosphate flux from the mucosal to the serosal side rose about 2—3 times. In the opposite direction, the increase was very small and only significant under anaerobic conditions. The uptake into the intestinal tissue did not increase anaerobically.

4. The phosphate concentration in the fluid produced on the serosal side was 1,5 times, and the glucose concentration 1,8 times higher than in the mucosal fluid.

5. Azide, NaF and phlorrhizin activated the phosphate penetration. Iodoacetic acid had no influence. Further it did not inhibit the phosphate flux increased by DNP in spite of an inhibition of glycolysis.

6. Phlorrhizin concentrations between 10^{-3} and 10^{-2} mol increased the phosphate flux, whereas the glucose transport was already inhibited by concentrations between 10^{-6} and 10^{-5} mol.

Literatur

[1] Darlington, W. A., and I. H. Quastel: Arch. Biochem. **43**, 194 (1953).

[2] Donhöffer, S.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **177**, 689 (1935).

* Auch an der Niere wurde gefunden, daß unter Phlorrhizin die Rückresorption von Phosphat zunimmt [J. J. Cohen, F. Berglund u. W. D. Lotspeich, Amer. J. Physiol. **189**, 331 (1957)].

[3] Fisher, R. B., and D. S. Parsons: J. Physiol. (Lond.) **110**, 36 (1949).
[4] Gibson, Q. H., and G. Wisman: Biochem. J. **48**, 426 (1951).
[5] Gossweiler, N., K. Kipfer, G. Poretti u. W. Rummel: Pflügers Arch. ges. Physiol. **260**, 154 (1954).
[6] Gourley, R. H.: Amer. J. Physiol. **164**, 213 (1951).
[7] Lang, K.: Der intermediäre Stoffwechsel. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1952, S. 369.
[8] Laskowski, U.: Biochem. Z. **292**, 319 (1937).
[9] Lesly Iervis, E., F. R. Johnson, U. F. Sheff and D. H. Smyth: J. Physiol. (Lond.) **134**, 675 (1956).
[10] Lutwak-Mann, C., and A. M. Barrett: Biochem. J. **40**, P V (1946).
[11] McHardy, G. I. R., and D. S. Parsons: Quart. J. exp. Pyhsiol. **41**, 398 (1956).
[12] Nelson, N.: J. biol. Chem. **153**, 395 (1944).
[13] Pfleger, K., W. Rummel u. H. Jacobi: Biochem. Z. **330**, 303 (1958).
[14] Prankerd, T. A. J.: Int. Rev. Cytol. **5**, 279 (1956).
[15] Roche, I.: The Enzymes. New York: Academic Press **1**, 473 (1950).
[16] Rosenberg, Th., and W. Wilbrandt: Int. Rev. Cytol. **1**, 65 (1952).
[17] Rummel, W., H. Jacobi, K. Pfleger u. H. Stupp: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 246 (1957).
[18] Rummel, W., K. Pfleger u. E. Seifen: Biochem. Z. **330**, 310 (1958).
[19] Smyth, D. H., and C. B. Taylor: J. Physiol. **136**, 632 (1957).
[20] Weil-Malherbe, H., and R. H. Green: Biochem. J. **49**, 286 (1951).
[21] Wilbrandt, W., u. L. Laszt: Biochem. Z. **259**, 398 (1933).
[22] Wilson, T. H., and T. N. Vincent: J. biol. Chem. **216**, 851 (1955).
[23] Zetterqvist, H.: The ultrastructural organisation of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Stockholm: Aktiebolaget Godvil 1956.

Prof. Dr. W. Rummel u. Dr. K. Pfleger, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstr. 5

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 414—418 (1958)

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Reaktivierung der Glucoseresorption

Von

W. Rümmel, K. Pfleger und H. Jacobi

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 2. Juni 1958)

Reaktivierung der Glucoseresorption

Seit 1933 Wilbrandt u. Laszt[26,15] ihre Hypothese veröffentlichten, besteht bis auf einige Ausnahmen[5,25,27] weitgehende Übereinstimmung darin, daß für die Glucoseresorption durch den Darm Phosphorylierungsprozesse eine Bedeutung haben. Die Zahl der Indizien hierfür hat zugenommen[3,4,6,9,13,19,23], aber direkte Beweise fehlen immer noch. Genaue Vorstellungen über den Mechanismus sind augenblicklich noch nicht möglich.

Hängt der Transport tatsächlich nur von einer Phosphorylierung der Glucose ab, warum funktioniert er dann nicht mehr unter anaeroben Verhältnissen und unter Dinitrophenol ([7] und vorangehende Mitteilungen), wo mit erhöhter Glykolyse die Phosphorylierung des Zuckers beträchtlich zunimmt? Da unter anaeroben Bedingungen und Dinitrophenol der Glucosetransport durch die Mucosa aufhört, scheint die oxydative Phosphorylierung, mit anderen Worten die verfügbare Menge an ATP, für den Vorgang von Bedeutung zu sein.

Bei der vorausgehenden Untersuchung des Phosphatdurchtritts durch die Darmwand unter dem Einfluß von Phosphataseinhibitoren wurde in einigen Versuchen beiläufig beobachtet, daß die durch Dinitrophenol gehemmte Glucoseresorption unter der gleichzeitigen Einwirkung von Azid wieder bis zu einem gewissen Grade in Gang kam. Da Dinitrophenol die Adenosintriphosphatase aktiviert und Azid sie hemmt[11,14,18,21,22], scheint tatsächlich die verfügbare ATP-Menge eine Rolle zu spielen. Wir haben deshalb diese Reaktivierung der Glucoseresorption durch einen zweiten Inhibitor an weiteren Beispielen untersucht.

Methode

Es wurde nur der Innenflüssigkeit Glucose zugesetzt und die nach außen durchgetretene Menge nach Nelson[16] bestimmt. Einzelheiten sind den beiden vorangehenden Mitteilungen zu entnehmen.

Ergebnisse

Die Hemmung des Transports von Glucose durch die intestinale Mucosa mit Dinitrophenol (DNP, Phlorrhizin, Azid und unter anaeroben Bedingungen am isolierten Darm wurde wiederholt beschrieben ([7,8,12,23] und vorangehende Mitteilung).

Die Wirkung von *Natriumfluorid* (NaF) und *Monojodessigsäure* (MJE) ist am isolierten Darm, soweit wir sehen, noch nicht untersucht. Sie schien einmal zum Vergleich mit dem Einfluß der beiden Stoffwechselgifte auf den Phosphattransport interessant (siehe vorangegangene Mitteilung) und zum anderen deshalb, weil die hier verwendeten Konzentrationen der beiden Inhibitoren auf die normale aerobe Glykolyse nicht einwirken (siehe vorangehende Mitteilung). Außerdem wurde Azid verwendet und zwar in einer Konzentration, die zum Unterschied zu den Versuchen von Darlington u. Quastel[7] die normale Atmung nicht beeinflußt (Kontrollen in der Warburg-Apparatur). Wenn unter diesen Bedingungen eine Hemmung

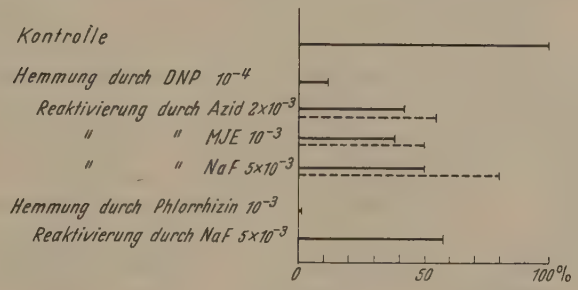


Abb. 1. Glucose-Durchtritt von Mucosa- zur Serosaseite. - - - - - - - Alleinwirkung der reaktivierenden Substanzen

der Glucoseresorption eintrat, dann mußte es sich um einen sehr differenten Angriffspunkt handeln, weil eine mittelbare Wirkung über Atmung bzw. Glykolyse auszuschließen war.

Die Tabelle zeigt, daß *MJE und Azid den Glucosetransport um rund 40% reduzieren.* NaF hingegen besitzt keine statistisch zu sichernde Hemmwirkung in einer Konzentration, die wie die vorangehende Untersuchung zeigte, den Phosphatdurchtritt um 170% steigert, während unter MJE keine Zunahme des Phosphatdurchtritts und unter Azid ein Anstieg um 80% zu verzeichnen ist.

Nachdem die Eigenwirkung von MJE, Azid und NaF bekannt war, wurde untersucht, inwieweit es gelingt, den durch *DNP gehemmten Glucosetransport durch gleichzeitige Einwirkung dieser drei Inhibitoren zu reaktivieren.* Wie die Abbildung beweist, ließ sich der *Glucosetransport*, der unter DNP im Durchschnitt auf 10—15% abgefallen war, *durch Azid, MJE und NaF um rund das Dreifache wieder erhöhen.* Das ist eine ganz beträchtliche Reaktivierung, wenn man berücksichtigt, daß in einzelnen Versuchen unter DNP die Hemmung so stark war, daß meßbare Werte unterschritten wurden (siehe Tabelle).

Zur Vervollständigung des Bildes sei noch vermerkt, daß bei den Versuchen mit Azid sich die steigernde Wirkung auf den Phosphatdurchtritt

zu der Steigerung durch DNP hinzuaddierte (Phosphatdurchtritt: Kontrolle = 3,7; DNP = 9,1; Azid = 6,8; DNP + Azid = 15,0 · 10^{-3} μMol/mg Tgw/Std). Dieses Verhalten ist ein weiterer Beweis dafür, daß Glucoseresorption und Phosphatdurchtritt voneinander weitgehend unabhängig sind (siehe vorangehende Mitteilung).

Auch an der *Phlorrhizinhemmung* ließ sich die Reaktivierung mit NaF zeigen. Dieser Effekt ist ganz besonders eindrucksvoll, weil die verwendete Phlorrhizinkonzentration die Glocuseresorption praktisch völlig

Tabelle

Glucose-Durchtritt in µg/mg Trockengewicht und Stunde bei 37° C

Kontrolle	DNP 10^{-4}	Azid $2 \cdot 10^{-3}$	DNP + Azid	MJE 10^{-3}	MJE + DNP	NaF $5 \cdot 10^{-3}$	NaF + DNP	Phlorrhizin 10^{-3}	NaF + Phlorrhizin
74,0	12,8	80	10,7	35,3	31,0	74,6	45,4	—*	26,4
54,8	11,6	24	37,3	37,3	32,7	55,8	34,8	—	17,5
35,3	9,0	28,4	41,0	27,6	20,0	49,0	31,9	—	29,7
96,5	— *	31,7	17,4	23,5	17,8	26,0	47,7	—	41,5
41,7	—	32,0	17,2		20,0	53,6	17,9	—	53,0
56,0	13,4	8,4	19,8		22,8	33,4	24,7		64,6
74,0	—		14,8			60,6	17,9		25,5
	9,1		52,3						27,4
	12,1								35,2
M = 62,0	7,5	34,0	26	31	24	50	31,4		36
10^{-1} µmol=*3,4*	*0,4*	*1,9*	*1,4*	*1,7*	*1,3*	*2,8*	*1,7*	*<0,5*	*2,0*
δ = ±1,1	±0,2	±1,3	±0,83	±0,36	±0,35	±0,91	±0,67		±0,83

* < 9,0.

blockiert und in Gegenwart von *NaF nahezu 60% der normalen Resorption wieder erreicht werden*. Azid und MJE wurden hier nicht geprüft.

Das Resultat dieser Untersuchungen ist, daß die durch DNP bzw. Phlorrhizin gehemmte Glucoseresorption durch einen zweiten Inhibitor, Azid, MJE oder NaF, wieder aktiviert wird. Eine Wirkung auf den oxydativen Stoffwechsel scheint dabei keine Rolle zu spielen. Das wird bei dem Antagonismus zwischen Phlorrhizin und NaF, die beide ohne Einfluß auf die Atmung sind, evident. Obwohl mit MJE die durch DNP gesteigerte Glykose wieder zur Norm reduziert wird (siehe vorangehende Mitteilung), geht aus der vergleichsweise viel schwächeren Hemmung mit NaF und der Tatsache, daß im Falle von Phlorrhizin die Hemmung der Glucoseresorption gar nicht mit einer gesteigerten Glykolyse einhergeht, eindeutig hervor, daß auch Effekte, die den glykolytischen Stoffwechsel beeinflussen, nicht als solche unmittelbar auf den Glucosetransport einwirken.

Diskussion

Es ist der Nachteil vieler Stoffwechselinhibitoren, daß sie nicht elektiv einen enzymatischen Vorgang hemmen. Man kann also nur versuchen, durch Vergleich verschiedener Inhibitoren in möglichst niedriger Konzentration und bei möglichst weitgehender Erfassung ihrer Wirkung, den für einen Transportmechanismus unmittelbar verantwortlichen enzymatischen Prozeß einzuengen. Wird einfach durch Hemmung von Atmung oder Glykolyse ein Transport gebremst, dann kann das nur ganz allgemein bedeuten, daß es an treibender Kraft fehlt. Wie die Transmission erfolgt, d.h., wie Energiestoffwechsel und Transportvorgang miteinander gekoppelt sind, läßt sich so nicht erkennen[24].

Die Hemmung der Glucoseresorption durch MJE, NaF und Azid unter unseren Bedingungen muß mit einer anderen als der geläufigen Wirkung dieser Stoffwechselgifte auf Glykolyse bzw. Atmung zusammenhängen, da die verwendeten MJE- und NaF-Konzentrationen die Glykolyse und die Azidkonzentration die Atmung nicht hemmten. Da MJE, NaF und Azid die ATP-ase hemmen[10,11,18] und die eigentliche Funktion der ATP-ase möglicherweise eine Katalyse der Transphosphorylierung ist, ähnlich wie das für andere Phosphatasen angenommen wird[1,2,17], wäre denkbar, daß eine Hemmung des Glucosetransports bei unveränderter Atmung bzw. Glykolyse auf einer Hemmung der ATP-ase beruht.

Es bleibt der Befund zu erklären, wie es möglich ist, mit diesen 3 ATP-Ase-Inhibitoren, die selbst den Glucosetransport hemmen, eine durch DNP bzw. Phlorrhizin weitgehend gebremste Glucoseresorption zu reaktivieren. Da DNP die ATP-Spaltung aktiviert[11,14,18,21,22] so, daß ATP sein γ-Phosphat an Wasser anstatt an organische Verbindungen abgibt und damit auch der Glucosetransport aufhört, könnte man sich schon vorstellen, daß ATP-Ase-Inhibitoren ein Absinken der ATP-Konzentration unter kritische, d. h. für den Glucosetransport nötige Werte verhindern. Ob auch Phlorrhizin ähnlich wie DNP auf die ATP-Ase wirkt, ist, soweit wir sehen, noch nicht bekannt. Es muß allerdings wahrscheinlich mit einer anderen Möglichkeit gerechnet werden, da Phlorrhizin z. B. nicht wie DNP die Glykolyse steigert (siehe vorangehende Mitteilung).

Sicher ist die Phosphorylierung für den Glucosetransport ein wichtiger Schritt, aber, wie die Tatsache eines erhöhten, glykolytischen Glucoseverbrauchs bei gleichzeitig gehemmtem Glucosetransport zeigt[22], scheint der entscheidendere Vorgang der zu sein, durch den die Glucose bei der Passage nach der Phosphorylierung vor einem weiteren Abbau bewahrt wird. Vielleicht hilft ein genaues Studium der Intermediärprodukte durch Markierung mit P^{32} unter der Einwirkung dieser Inhibitoren weiter.

Summary

1. Iodoacetic acid and NaF, concentrations without influence on the basal resting level of aerobic glycolysis, inhibited the glucose absorption of the isolated intestine.

2. Glucose absorption inactivated by DNP, could be reactivated by azide, iodoacetic acid and NaF.

3. NaF also restored the glucose absorption inhibited completely by phlorrhizin.

Literatur

[1] Appleyard, J.: Biochem. J. **42**, 596 (1948).
[2] Axelrod, B.: J. biol. Chem. **172**, 1; **176**, 295 (1948).
[3] Beck, L. V.: J. biol. Chem. **143**, 403 (1942).
[4] Bissegger, A., u. L. Laszt: Helv. physiol. pharmacol. Acta **9**, C 60 (1951).
[5] Crane, R. K., and S. M. Krane: Biochim. biophys. Acta **20**, 568 (1956).
[6] Csaky, T.: Science **118**, 253 (1953).
[7] Darlington, W. A., and J. H. Quastel: Arch. Biochem. **43**, 194 (1953).
[8] Fisher, R. B.: J. Physiol. (Lond.) **130**, 655 (1955).
[9] Hele, M. P.: Nature (Lond.) **166**, 786 (1950).
[10] Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie, S. 342, Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1954.
[11] Hunter, F. E.: Proc. 3rd Int. Congr. Biochem. Brussels, S. 298 (1955).
[12] Jervis, E. L., F. R. Johnson, U. F. Sheff and D. H. Smyth: J. Physiol. (Lond.) **134**, 675 (1956).
[13] Kjerulf-Jensen, K.: Acta physiol. scand. **4**, 225 (1942).
[14] Lardy, H. A., and H. Wellman: J. biol. Chem. **201**, 357 (1953).
[15] Laszt, L., u. H. Sullmann: Biochem. Z. **278**, 401 (1935).
[16] Nelson, N.: J. biol. Chem. **153**, 395 (1944).
[17] Meyerhof, O., and H. Green: J. biol. Chem. **183**, 377 (1950); Fed. Proc. **9**, 179 (1950).
[18] Myers, D. K., and E. C. Slater: Biochem. J. **67**, 572 (1957).
[19] Papadopulos, N. M., and J. H. Roe: Amer. J. Physiol. **189**, 301 (1957).
[20] Pfleger, K., W. Rummel u. H. Jacobi: Biochem. Z. (im Druck).
[21] Potter, V. R., and R. O. Recknagel: Phosphorus Metabolism **1**, 377, Baltimore, J. Hopkins Press. (1951).
[22] Potter, V. R., P. Siekevitz and H. C. Simonson: J. biol. Chem. **205**, 893 (1953).
[23] Riklis, E., and J. H. Quastel: Canad. J. Biochem. **36**, 363, 373 (1958).
[24] Rummel, W.: Naturwissenschaften **40**, 277 (1953).
[25] Sols, A.: Biochim. biophys. Acta **19**, 144 (1956).
[26] Wilbrandt, W., u. L. Laszt: Biochem. Z. **259**, 398 (1933).
[27] Wilson, T. H., and T. N. Vincent: J. biol. Chem. **216**, 851 (1955).

Prof. Dr. W. Rummel u. Dr. K. Pfleger, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstr. 5

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 419—425 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler) und der Psychiatrisch-Neurologischen Klinik (suppl. Vorstand: Prof. Dr. H. Bertha) der Universität Graz

Einfluß der Substanz P auf die elektrische Aktivität des Gehirns

Von

H. Lechner und **F. Lembeck**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1958)

Substanz P wird vorwiegend in den Stammhirngebieten gefunden, (Kopera u. Lazarini 1953, Pernow 1953, Zetler u. Schlosser 1955, Amin, Crawford u. Gaddum 1954.) Die relativ hohen Mengen von Substanz P in den Hinterwurzeln ließen auf eine Beeinflussung der afferenten Reizleitung im Zentralnervensystem schließen (Lembeck 1953), wofür auch der hohe Substanz P-Gehalt in den Columnae dorsales und in den Nuclei gracilis und cuneatus spräche (Amin, Crawford u. Gaddum 1954). Dunér, Euler u. Pernow (1954) fanden ferner große Mengen Substanz P in der Retina.

Euler u. Pernow (1956) injizierten Substanz P Katzen und Kaninchen intracysternal und intraventrikulär. Bei Kaninchen führten 25 E Substanz P zu einer etwa $^1/_2$stündigen Hyperpnoe und stuporösem Verhalten nach intracysternaler Injektion; intraventrikulär zeigten schon 2 E eine Wirkung. Auch bei Katzen kam es nach Injektion von 1—10 E Substanz P in den III. Ventrikel nach kurzer initialer Hemmung zu einer langdauernden Hyperpnoe, eine Wirkung, die auch bei Injektion in die A. carotis zu sehen war. Außerdem wurden Hemmung der Spontanmotilität, gelegentliche Leckbewegungen und in einem Fall Erregung und aggressive Tendenzen beobachtet.

Zetler (1956) fand deutliche zentrale Wirkungen nach subcutaner Injektion großer Mengen Substanz P (9000 E/kg) bei Mäusen. Die Tiere reagierten mit depressivem Verhalten, verringerter Empfindlichkeit gegenüber zentralen Erregungsmitteln, erhöhter Schmerzempfindlichkeit, ferner wurde die Morphinwirkung durch Substanz P teilweise gehemmt. Außerdem war unmittelbar nach der Injektion Unruhe und Zuckungen zu beobachten. Stern u. Hukovic (1956) beschrieben eine Hemmung der Tetanustoxinwirkung durch Substanz P, sowie einen Synergismus zwischen Mephenesin und Substanz P.

Substanz P des Gehirns ist nach allen bisherigen Befunden mit der aus dem Darm gewonnenen identisch (Eliasson, Lie u. Pernow 1956). Die darmkontrahierende Wirkung von Substanz P wird als unmittelbare Wirkung auf die glatte Muskelfaser erklärt (Pernow 1953). Blair u. Clark (1956) bestätigten, daß die Wirkung am glatten Muskel nicht ganglionär sein kann, und zeigten, daß der Erregungsmechanismus der Substanz P empfindlicher als der anderer muskulär wirkender Stoffe ist; sie vermuten, daß die Receptoren durch Substanz P nicht unmittelbar gereizt werden, sondern eine „trophische Wirkung auf Amplitude und

Spontankontraktion ausgeübt wird". Demnach lassen die bisherigen Befunde am Darm kaum Rückschlüsse auf eine mögliche Wirkungsweise der Substanz P im Zentralnervensystem zu.

Um Aufschluß über die Wirkung von Substanz P auf das Zentralnervensystem zu bekommen, wurde im folgenden ihr Einfluß auf die elektrische Aktivität des Cortex und des Hippocampus untersucht.

Methodik

Es wurden Kaninchen im Gewicht von 2—3 kg in leichter Urethannarkose (1,0 g/kg) verwendet. Zur Injektion der Substanz P wurde ein PVC-Schlauch in die linke A. carotis eingebunden und mittels eines Troikars unter der Haut des Nackens nach außen geführt, um das Tier bei der Injektion durch Berührung nicht zu irritieren.

Zur Überprüfung des Versorgungsgebietes der A. carotis wurde die Verteilung von 3 bzw. 6 cm^3 Tusche nach Injektion in die A. carotis am lebenden Tier und andererseits durch Füllung der Gefäße am toten Tier nach vorhergehender Verabreichung von Liquemin untersucht. Makroskopisch konnte bei allen Versuchstieren eine Füllung der A. basilaris über die A. communicans post. beobachtet werden. Die histologische Untersuchung ergab Tuscheteilchen im Hirnstamm und Cortex; ein Seitenunterschied war jedoch nur dann nachweisbar, wenn die Injektion am toten Tier vorgenommen wurde.

Auch durch den Befund von White u. Himwich (1957) ist nach Injektion in die A. carotis eine Verteilung der Injektionslösung sowohl auf den Cortex als auch auf die Stammhirngebiete beiderseits anzunehmen.

Zur Aufnahme des Elektrencephalogramms kamen zwei Ableitungsschemata zur Anwendung. Beim ersteren fanden 4 Elektroden Verwendung: 2 Elektroden präzentral und 2 postzentral wurden symmetrisch am Kopf etabliert. Im anderen Fall wurden 8 Elektroden, je 2 präzentral und postzentral symmetrisch angelegt (Methode nach Monnier u. Laue 1953) und bipolar abgeleitet. Die Tiefenelektroden wurden nach der von Sailer u. Stumpf (1957) angegebenen Methode eingebracht. Die Lage der Tiefenelektroden wurde im Anschluß an den Versuch einer histologischen Kontrolle unterzogen. Zur Registrierung fand ein Gerät der Fa. Schwarzer und ein Grass-Modell 3D Verwendung.

Als Substanz P wurde ein durch Ammonsulfat-Fällung gewonnenes Präparat mit 5,6 E/mg verwendet, das wir Herrn Dr. Kerschbaum, Fa. Sanabo-Wien, verdanken.

Ergebnisse

Die rasche Injektion von 1—2 ml physiologischer Kochsalzlösung in die A. carotis zeigte weder einen Einfluß auf die Oberflächenaktivität noch auf die des Hippocampus. Durch akustische Reize, und besonders deutlich durch Schmerzreize (Abb. 1) konnte eine Arousal-Reaktion ausgelöst werden. Als weitere Kontrolle wurde im Hinblick auf den von Gangloff u. Monnier (1957) beschriebenen Einfluß des p_H auf die elektrische Aktivität des Gehirnes die Substanz P-Lösung, die ein p_H 6 hatte, mit NaOH auf p_H 7,5 gebracht und vergleichsweise injiziert, wobei sich jedoch kein Unterschied ihrer Wirkung ergab. Schließlich wurde eine Lösung von 100 Einh. Substanz P/ml mit 1 mg Trypsin (Tryptar, Armour Lab.) ml 30 min bei p_H 7,5 inkubiert, wodurch mehr als 90% der Substanz P

zerstört wurden; hiervon wurde eine 50 E Substanz P entsprechende Dosis injiziert, wobei kein Einfluß auf das EEG festzustellen war.

a) Die Wirkung von Substanz P auf das EEG. Im Elektrencephalogramm konnte man nach Injektion von 30—100 E Substanz P in die A. carotis zwei verschiedene Reaktionen feststellen: In der Minderzahl unserer Versuche konnte präzentral eine Verlangsamung der Frequenz nach Verabreichung von Substanz P beobachtet werden. Gleichzeitig bestand auch eine Abnahme der Amplitude. Wenn ein Grundrhythmus

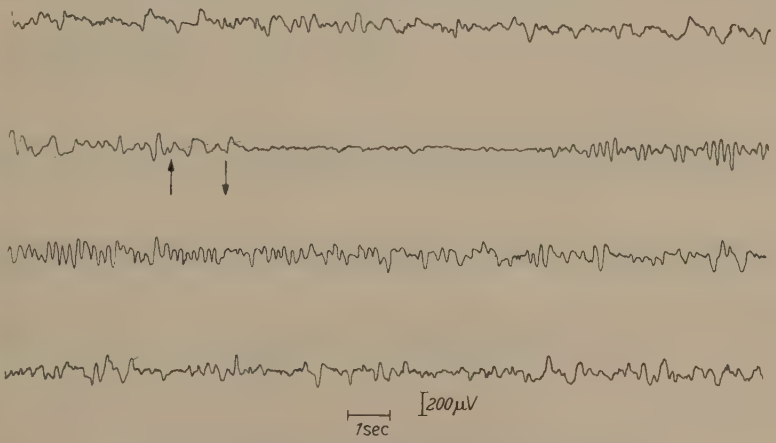


Abb. 1. Auftreten einer Arousal-Reaktion nach Kneifen des Ohres ↑ ↓. Ableitung beiderseits frontal. Fortlaufende Registrierung

von $1^1/_2$—2/sec und 150—170 Mikrovolt präzentral vor der Verabreichung von Substanz P vorhanden war, so waren unmittelbar danach 1/sec-Wellen von 100 Mikrovolt nachweisbar. In den postzentralen Gebieten konnte sofort eine Beschleunigung der Grundfrequenz und eine Abnahme der Amplitude beobachtet werden. Bei einer Grundfrequenz von 3/sec und 170 Mikrovolt war nach Verabreichung von 30—100 E Substanz P ein Rhythmus von 5—6/sec und 20 Mikrovolt festzustellen. Nach ungefähr 1 min trat jedoch ebenso präzentral eine Frequenzbeschleunigung auf, so daß 4/sec-Wellen von 100 Mikrovolt beobachtet wurden. Die zweite Reaktion, die in der überwiegenden Zahl unserer Fälle gesehen wurde, war derart, daß die Grundaktivität von $1^1/_2$ bis 3/sec und 50—200 Mikrovolt, bei der die Wellen präzentral eine höhere Amplitude zeigten, blockiert wurde und es zum Auftreten von 3—5/sec-Wellen von 30—80 Mikrovolt im Anschluß an die Injektion kam. Die schnelleren Frequenzen waren präzentral deutlicher nachweisbar als postzentral. Ebenso zeigten diese Wellen auch eine höhere Amplitude präzentral. Das Auftreten der schnellen Frequenzen war bereits nach der

Injektion angedeutet vorhanden, jedoch waren diese im Durchschnitt erst nach 1—2 min am deutlichsten (Abb. 2) zu sehen. Nach einer weiteren Minute kam es dann zu einer Annäherung an die ursprüngliche Aktivität.

Die Wirkung auf das EEG war dosisabhängig. Auf 10 E Substanz P konnte nur eine geringe oder gar keine Reaktion des Hirnstrombildes festgestellt werden. Mit zunehmender Erhöhung der Dosis wurde dann der Effekt auf das EEG immer ausgesprochener, die Blockierung deutlicher, ebenso hielten die schnellen Frequenzen eine längere Zeit an und

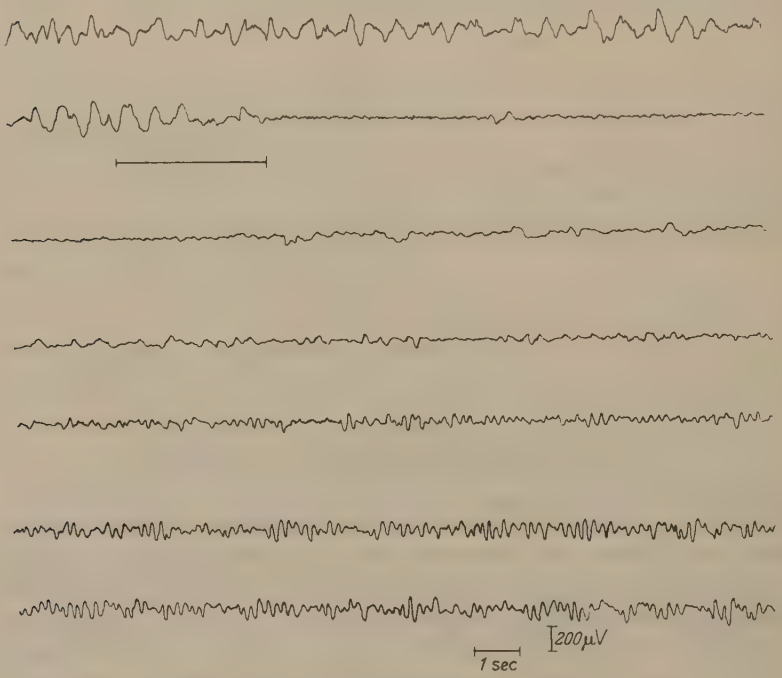


Abb. 2. Injektion von 30 E Substanz P in die A. carotis. Ableitung beiderseits frontal. Fortlaufende Registrierung

bildeten den dominierenden Rhythmus bis sie wieder von der primären Grundfrequenz abgelöst wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß fast bei allen unseren Versuchen die Verabreichung von Substanz P eine Arousal-Reaktion auslöste. Außerdem konnte nach 100 E Substanz P fast immer eine Bewegung des Kopfes beobachtet werden.

b) Die Wirkung von Substanz P auf die Aktivität des Hippocampus. Nach Injektion von 30—100 E Substanz P in die A. carotis wurde unabhängig von der Ausgangsfrequenz eine Zunahme derselben festgestellt. Bei einer Grundfrequenz von 1—3/sec und 150—300 Mikrovolt

konnte im Anschluß an die Verabreichung von Substanz P das Auftreten von 4—6/sec-Wellen von 200—300 Mikrovolt beobachtet werden. Es wurde ferner festgestellt, daß es zu einer sehr deutlichen Synchronisation der zeitweise unregelmäßigen Grundrhythmen kam (Abb. 3). Die Reaktion der Substanz P auf die Aktivität des Hippocampus war dosisabhängig. Mit zunehmender Dosis, d. h. von 10—100 E Substanz P wurde die Wirkung auf die Aktivität des Hippocampus immer deutlicher. Intravenöse Verabreichung von 100 E Substanz P hatte nur einen undeutlichen Einfluß auf die Hippocampusaktivität, wobei eine ganz

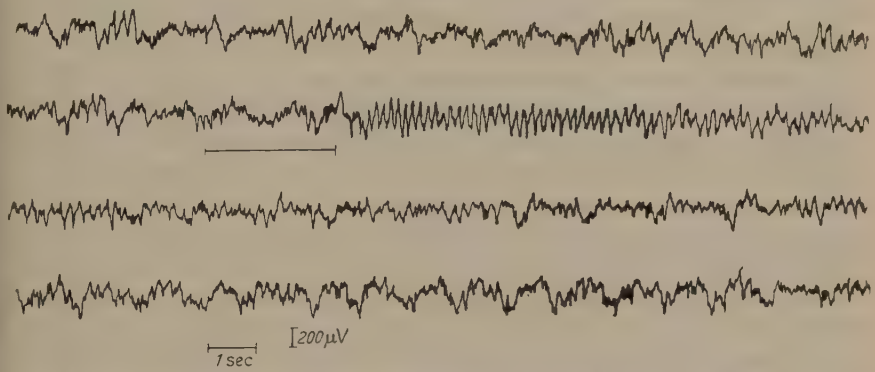


Abb. 3. Die Aktivität des Hippocampus nach Injektion von 30 E Substanz P in die A. carotis. Fortlaufende Registrierung

geringe Beschleunigung des Grundrhythmus mit Synchronisation beobachtet wurde. Niedrigere Dosen von Substanz P, intravenös verabreicht, zeigten hingegen keinen erkennbaren Einfluß auf die Aktivität des Hippocampus.

Besprechung der Ergebnisse

Die Injektion von Substanz P in die A. carotis zeigt elektrencephalographische Veränderungen, die auch mit höherer Dosierung bei intravenöser Verabreichung nur angedeutet beobachtet werden konnten. Daraus ist zu entnehmen, daß nicht die peripheren Wirkungen (Blutdrucksenkung, Darmmotilitätssteigerung) dieser Substanz als Ursache dafür anzusehen sind, sondern daß das Eindringen der Substanz in das Gehirn für die elektrencephalographischen Veränderungen verantwortlich zu machen ist, sofern in die A. carotis injiziert wurde. Bei intravenöser Injektion kann die Konzentration der Substanz P in den Gehirngefäßen, sei es infolge Bindung derselben in verschiedenen Organen oder durch raschen enzymatischen Abbau, bereits zu gering geworden sein, um noch eine Wirkung entfalten zu können. Die Frage der Spezifität der beobachteten Wirkung von Substanz P bedarf deshalb einer Erörterung,

weil das verwendete Präparat mit 5,6 E/mg noch verhältnismäßig wenig gereinigt ist; doch besteht insofern eine Sicherheit, als keine anderen bekannten Stoffe mit biologischer Wirksamkeit darin enthalten sind und nach enzymatischer Inaktivierung keine Wirkung auf das EEG mehr vorhanden war. Das EEG zeigte nach Injektion von mehr als 30 E Substanz P in die A. carotis Anzeichen einer Aktivierung, die ähnlich einer Arousal-Reaktion sind und durch das Verhalten der Tiere (Kopfbewegung, Streckung, rasche Bewegungen) meist noch augenscheinlicher werden. Die Frequenzerhöhung, die Amplitudenabnahme im EEG und die Frequenzzunahme im Hippocampus sind mit den Beobachtungen von Jung u. Kornmüller (1939) zu vereinbaren, die kürzlich von Sailer u. Stumpf (1957) studiert wurden. Letztere fanden nach proprio- und nociceptiven Reizen, nach elektrischer Reizung der retikulären Formation des Mittelhirns, sowie nach Verabreichung von Physostigmin in der Hippocampustätigkeit einen Indicator für die Aktivität der ascendierenden retikulären Systeme. Unter Zugrundelegung dieser Erfahrungen könnten unsere Befunde ebenfalls auf eine Aktivierung dieser Systeme durch die Substanz P zurückgeführt werden. Während aber die Aktivierung durch elektrische Reizung des retikulären Systems zuerst eine Frequenzerhöhung und dann ein Absinken derselben im Hippocampus (Sailer u. Stumpf 1957) zeigte, sahen wir nach Substanz P nur eine Frequenzerhöhung, die sich dann wiederum der Ausgangsfrequenz nähert. In einigen Versuchen gewannen wir den Eindruck, daß die Wirkung von Substanz P nach mehr als 4—5 Injektionen, die in einem kurzen Abstand verabreicht wurden, abnahm. Da die untersuchten Tiere in leichter Urethanarkose waren, schalteten wir die Rückwirkung von geringen äußeren Reizen, die beim wachen Kaninchen nach Gangloff u. Monnier (1956) eine bedeutende Rolle auf die Gehirnaktivität spielen, weitgehend aus. Jedoch konnten wir bei einigen Versuchstieren noch eine Arousal-Reaktion durch akustische Stimulation auslösen.

Neben der von Sailer u. Stumpf (1957) durch Physostigmin erzielten Aktivierung, die letzten Endes eine Verstärkung des frei werdenden Acetylcholins darstellt, können unsere Befunde als zweite Möglichkeit einer Aktivierung durch eine körpereigene Substanz gelten. Aus den vorliegenden Versuchen geht zunächst nur hervor, daß Substanz P einen Einfluß auf das EEG und die Aktivität des Hippocampus ausübt, über dessen Lokalisierung erst weitere Versuche Auskunft geben können. Da es zu einer Arousal-Reaktion kam, muß man eine Aktivierung der Formatio reticularis durch Substanz P annehmen, welche durch direkte Wirkung in der Formatio reticularis oder aber durch afferente Reizleitung mit Wirkung auf die Formatio reticularis zustande gekommen sein kann (Moruzzi u. Magoun 1949, Moruzzi 1954). Während Rinaldi u. Himwich (1955) und Sailer u. Stumpf (1957) eindeutige Hinweise für

einen cholinergen Mechanismus der aszendierenden retikulären Systeme fanden, lassen die Befunde von Bradley u. Key (1956) die Möglichkeit nicht cholinerger Mechanismen im retikulären System bestehen. Schon Feldberg u. Vogt (1948) wiesen auf eine alternierende Folge cholinerger und nichtcholinerger Systeme im Zentralnervensystem hin und es wäre denkbar, daß Substanz P bei letzteren eine Rolle spielt.

Summary

The EEG of the cortex and the hippocampus has been recorded in rabbits after injection of substance P into the carotis artery. 30 to 100 units of substance P evoced the following effects:

1. The cortical activity showed a decrease in amplitude and an increase in frequency, most pronounced 1—2 min after the injection.

2. The hippocampus activity showed an increase in frequency synchronisation of the previously irregular basic pattern. These changes of electrical activity suggest an influence of substance P on activatingsystems.

Literatur

Amin, A. H., T. B. B. Crawford and J. H. Gaddum: J. Physiol. (Lond.) **126**, 596 (1954).

Blair, M. R., and B. B. Clark: J. Pharmacol. exp. Ther. **117**, 467 (1956).

Bradley, P. B., and B. J. Key: Abstr. XXth Internat. Physiol. Cong. Brüssel 1956, p 124.

Brücke, F., S. Sailer u. Ch. Stumpf: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 267 (1957).

Dunér, H., U. S. v. Euler u. B. Pernow: Acta physiol. scand. **31**, 113 (1954).

Euler, U. S. v., u. B. Pernow: Acta physiol. scand. **36**, 265 (1956).

Feldberg, W., and M. Vogt: J. Physiol. (Lond.) **107**, 372 (1948).

Gangloff, H., u. H. Monnier: Acta physiol. pharmacol. neerl. **6**, 755 (1957). — Electroenceph. clin. Neurophysiol. **8**, 623 (1956).

Jung, R., u. A. E. Kornmüller: Arch. Psychiat. Nervenkr. **109**, 1 (1939).

Kopera, H., u. W. Lazarini: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 214 (1953).

Lembeck, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 197 (1953); **230**, 1 (1956).

Monnier, H., u. H. Laue: Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 73 (1953).

Moruzzi, G.: Brain Mechanismus and consciouness. Oxfort: Blackwell Scientific Publications 1954.

Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Electroenceph. clin. Neurophysiol. **1**, 455 (1949).

Pernow, B.: Acta physiol. scand. **29**, Suppl. 105 (1953).

Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **73**, 387, 396 (1955).

Sailer, S., u. Ch. Stumpf: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 63 (1957).

Stern, R., u. S. Hukovic: Naturwissenschaften **43**, 538 (1956).

White, R. P., and H. E. Himwich: Amer. J. Physiol. **189**, 513 (1957).

Zetler, G., u. L. Schlosser: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 159 (1955).

etler, G.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 513 (1956).

Doz. Dr. F. Lembeck, Pharmakologisches Institut der Universität Graz/Österreich

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 426—431 (1958)

Aus den Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Untersuchungen über die Blutdruckreaktion am Meerschweinchen nach verschiedenartiger Applikation von bronchospastisch wirkenden Substanzen

Von
H. G. Kraft

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Juli 1958)

Die Blutdruckwirkung von i.v. verabreichten bronchospastisch wirkenden Substanzen ist bereits von vielen Autoren beschrieben worden[1,2,4–6,9–12,14,15,19–24,26–30]. Dabei konnte allgemein festgestellt werden, daß die beobachteten Reaktionen abhängig von der Tierart, von der Narkose und von der Versuchsanordnung unterschiedlich ausfielen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über den Einfluß von bronchospastisch wirksamen Pharmaka auf die vagale Atemphasenregulation, wobei ein unterschiedliches Verhalten der Trachealverschlußreaktionen nach i.v. und nach Spray-Applikation der gleichen Substanz festgestellt wurde[17,18], lag es nahe, zu untersuchen, ob nicht auch das Verhalten des arteriellen Blutdruckes abhängig von der Applikationsart Unterschiede zeigen würde.

Methodik

Die Versuche wurden an etwa 300—400 g schweren männlichen Meerschweinchen in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.) durchgeführt. Die Tiere befanden sich, wie bereits anderen Orts beschrieben[18], in einem Ganzkörperplethysmographen, nachdem sie vorher tracheotomiert waren und eine nach außen führende Trachealkanüle eingelegt war.

Der arterielle Blutdruck wurde aus der linken Art. carotis communis mit einem Glasmembranmanometer registriert. Auf einem Kathodenstrahloscillographen wurde gleichzeitig das mit Nadelelektroden abgeleitete Elektrokardiogramm beobachtet.

Um zu untersuchen, ob sich Unterschiede des Reaktionsverhaltens bei Spontanatmung und künstlicher Atmung ergaben, wurden sowohl Versuche bei spontan atmenden Tieren, als auch bei mit einer Atempumpe künstlich beatmeten Tieren durchgeführt. Bei den spontan atmenden Tieren registrierten wir die Atembewegungen als Plethysmogramm über eine Marey-Kapsel und den Trachealseitendruck über ein Glasmembranmanometer auf einen optischen Kymographen. Das absolute Lungenvolumen konnte aus Plethysmogramm und Trachealseitendruck pneumanometrisch errechnet werden (Bucher)[3]. Bei den mit der Atempumpe beatmeten Tieren wurden neben den Atembewegungen die Bronchialvolumenänderungen nach der von Konzett u. Rössler[13] angegebenen „overflow"-Methode bei einem Aufblasungsdruck von etwa 100 mm H_2O registriert. Neben der photooptischen

Registrierung dieser Vorgänge wurde das Bronchialvolumen auch auf einem Rußkymographen mit Hilfe eines Piston recorders aufgezeichnet.

Die untersuchten Substanzen wurden entweder durch eine in die V. jugularis ext. eingebundene Kanüle oder mit Hilfe eines Aerosol-Gerätes (Methodik siehe [18]) durch die nach außen geführte Trachealkanüle appliziert.

Versuchsergebnisse

Serotonin, am spontan atmenden Meerschweinchen *i.v.* verabreicht, ruft neben den bereits bekannten Atemveränderungen (Abnahme des Atemzugsvolumens, inspiratorische Stellung der Atemmittellage, Atemfrequenzzunahme und Abnahme der Atemphasen mit besonderer Betonung der inspiratorischen Atemphase)[18] eine dosenabhängige Senkung des arteriellen Blutdruckes hervor (Abb. 1). Diese Blutdruckreaktion kann am künstlich beatmeten Tier in gleicher Weise beobachtet werden (Abb. 2). Die Dauer und Intensität dieser Blutdruckänderung läuft mit der Dauer und Intensität der Atemveränderung parallel.

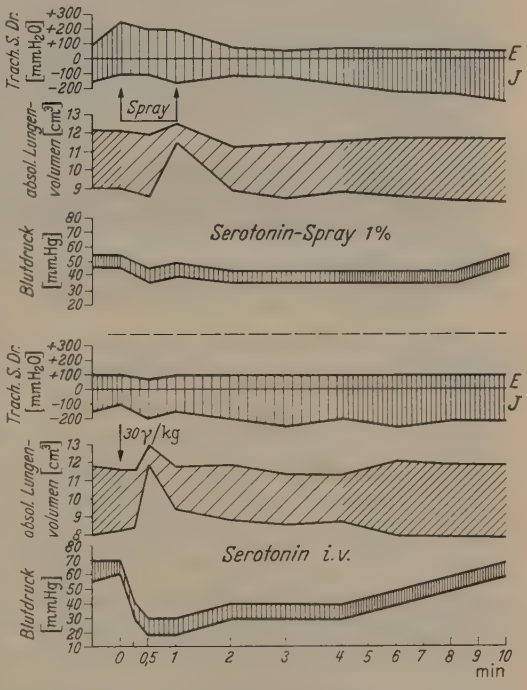


Abb. 1. Effekt eines Serotonin-Sprays und einer i.v. Serotoningabe auf Atmung und Blutdruck am *spontan atmenden* Meerschweinchen (Urethan-Narkose, 1,5 g/kg s.c.). Von oben: Trachealseitendruck, *J* inspiratorischer, *E* exspiratorischer Druck; Absolutes Lungenvolumen; Blutdruck. Spray-Dauer: 1 min

Unter einem *Serotonin-Spray* sind diese Blutdruckänderungen am spontan atmenden und am künstlich beatmeten Tier trotz viel intensiverer und länger anhaltender Atemveränderungen[17,18] nur noch eben angedeutet vorhanden. Auffallend ist, daß diese Atem- und Blutdruckänderungen auch viel langsamer einsetzen als nach i.v. Serotonin-Applikation (Abb. 1 u. 2).

Histamin i.v. gegeben und ein *Histamin-Spray* zeigten ähnliche Veränderungen im Verhalten der Atmung und des Blutdrucks, wobei jedoch alle Reaktionen nicht so stark ausgeprägt waren wie unter Serotonin-Verabreichung.

Besonders deutliche Blutdruckveränderungen bei jedoch etwas anders ablaufenden Atemveränderungen (keine Veränderung der Atemmittellage bei Verminderung des Atemzugsvolumens) wurden durch die i.v. Verabreichung von *Pilocarpin* erreicht. Die mit dem Piston recorder am künstlich beatmeten Tier registrierten Bronchialvolumenänderungen waren zwar intensiv, jedoch flüchtiger als nach Serotonin oder Histamin i.v.

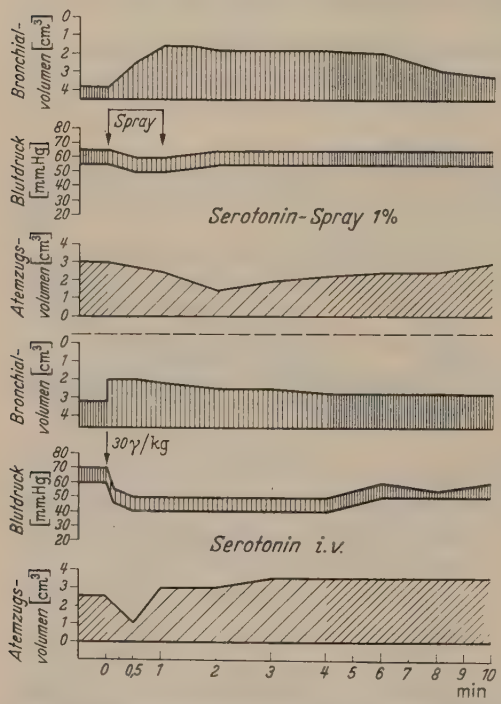


Abb. 2. Wirkung eines Serotonin-Sprays und einer i.v. Serotonin-Injektion auf das Bronchialvolumen und den Blutdruck des *künstlich beatmeten* Meerschweinchens in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.)

Ein *Acetylcholin-Spray* zeigte neben den bereits beschriebenen Atemveränderungen[18], die sich formell mit denen nach Serotonin- bzw. Histamin-Spray dekken, keinerlei Blutdruckreaktion. Ebenfalls war am künstlich beatmeten Tier kaum ein Bronchospasmus auslösbar; eine nachfolgende i.v. Injektion von Serotonin ergab jedoch am gleichen Tier sofort eine Abnahme des Bronchialvolumens im Sinne eines Bronchospasmus (Abb. 3).

Diskussion

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß die Blutdruckreaktion auf bronchospastisch wirksame Pharmaka am mit Urethan narkotisierten Meerschweinchen abhängig von der Applikationsart dieser Substanzen zu sein scheint. Nach Spray-Anwendung sind die Atemveränderungen intensiver als nach i.v. Applikation, die Blutdruckänderungen verhalten sich jedoch umgekehrt, d. h. sie sind nach i.v. Applikation der Substanzen deutlich, nach Spray-Verabreichung jedoch nur angedeutet vorhanden.

Frühere Untersuchungen am Meerschweinchen[18] ergaben, daß Histamin und Serotonin gleiche Atemveränderungen, Acetylcholin und Pilocarpin von ihnen und unter sich verschiedenartige Reaktionen hervorrufen. Wir konnten nun feststellen, daß der bronchoconstrictorische Effekt der vier Stoffe unter sich und auch abhängig von der Applikationsart verschieden ist.

Die i.v. Verabreichung dieser Pharmaka ergab nach unseren früheren Ergebnissen[18] auch ein andersartiges Verhalten der Trachealverschlußreaktionen als nach Spray-Applikation von Histamin und Serotonin, da nach i.v. Gaben von z. B. Histamin und Serotonin die exspiratorischen Trachealverschlußreaktionen sich verkürzten, nach Spray-Applikation sich aber verlängerten, trotzdem es stets zu einer Zunahme des absoluten Lungenvolumens kam. Die Blutdruckreaktion verhält sich entsprechend: i.v. Injektion der Substanzen bringt einen deutlichen dosenabhängigen Blut-

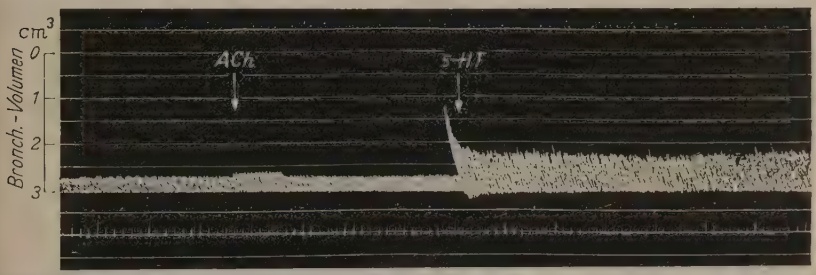


Abb. 3. Effekt eines Acetylcholin-Sprays (1%ig) (*ACh*) und einer nachfolgenden i.v. Serotonine Injektion (30 γ/kg) (*5—HT*) auf das Bronchialvolumen des Meerschweinchens in Urethan-Narkose (1,5 g/kg s.c.). Spray-Dauer: 1 min, Insufflationsdruck: 100 mm H_2O, Zeitschreibung: 1 min

druckabfall hervor, Spray-Applikation läßt den Blutdruckabfall nur ganz schwach erscheinen oder wie im Falle des Acetylcholins gänzlich vermissen.

Es scheinen also bei der i.v. Verabreichung der Substanzen andere Mechanismen abzulaufen als nach Spray-Verabreichung. Aus Arbeiten anderer Untersucher ist bekannt, daß einmal der Blutdruckabfall abhängig von der Höhe der gegebenen Dosis der zum Bronchospasmus führenden Substanz sein kann[1]. Zum anderen laufen aber auch Reaktionen über die Lungendehnungsreceptoren[4,28] und die Druck- und Chemoreceptoren des großen und kleinen Kreislaufes ab[4,5,7,8,10,12,14,16,20,21,23,25,27]. Diese könnten neben der Blutdruckänderung ohne weiteres auch eine Beeinflussung der vagalen Verschlußphasenreaktionen hervorrufen, was den Ausfall der exspiratorischen Trachealverschlußreaktion nach i.v. Gabe von Serotonin oder Histamin erklären würde. Demnach scheinen diese Regulationsmechanismen bei einer Spray-Applikation der gleichen Stoffe eine untergeordnete, wenn überhaupt eine Rolle zu spielen, da nach dieser Applikationsart die Blutdruckreaktion höchstens angedeutet ist, wohingegen die Trachealverschlußreaktionen besonders deutlich ausgeprägt sind. Dieses andersartige Verhalten könnte evtl. dadurch bedingt sein, daß in diesem Falle andersartige quantitative Verhältnisse z. B. an der Bronchialwand (Receptoren) herrschen oder die systemische Beeinflussung durch evtl. schnellen Abbau relativ gering ist. Über die Lungenreceptoren ablaufende Reflexe könnten somit wesentlich ungestörter zur Entfaltung kommen.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von Serotonin, Histamin, Pilocarpin und Acetylcholin auf verschiedene Atmungsfaktoren und auf die Blutdruckreaktion von spontan atmenden und künstlich beatmeten Meerschweinchen untersucht. Die Applikation der Pharmaka erfolgte sowohl als Aerosol als auch auf i.v. Wege.

Die i.v. Verabreichung ergab in allen Fällen einen deutlich dosenabhängigen Blutdruckabfall, der mit den Atemveränderungen parallel ablief. Die Spray-Applikation zeigte bei intensiver Atemveränderung nur eine angedeutete oder keine Blutdruckreaktion.

Die aus früheren Untersuchungen erhobenen Befunde des Ausfalls der vagal bedingten Trachealverschlußreaktion wurden mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Blutdruckreaktion verglichen und kurz diskutiert.

Literatur

[1] Balzer, H., K. Greeff u. E. Westermann: Die bronchoconstrictorische Wirkung des Serotonins. Klin. Wschr. **1956**, 1204.

[2] Barer, G. R., and E. Nüsser: The part played by bronchial muscles in pulmonary reflexes. Brit. J. Pharmacol. **8**, 315 (1953).

[3] Bucher, K.: Fortlaufende Registrierung des Lungenvolumens am Kaninchen. Pflügers Arch. ges. Physiol. **246**, 307 (1942).

[4] Comroe, J. H., jr., B. van Lingen, C. R. Stroud and A. Roncoroni: Reflex and direct cardiopulmonary effects of 5-OH-tryptamine (serotonin). Amer. J. Physiol. **173**, 379 (1953).

[5] Douglas, W. W., and C. C. Toh: Respiratory stimulant action of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the dog. J. Physiol. (Lond.) **120**, 311 (1953).

[6] Erspamer, V.: Pharmacology of indolealkylamines. Pharmacol. Rev. **6**, 425 (1954).

[7] Gaddum, J. H., C. O. Hebb, A. Silver and A. A. B. Swan: 5-Hydroxytryptamine. Pharmacological action and destruction in perfused lungs. Quart. J. exp. Physiol. **38**, 255 (1953).

[8] Ginzel, K. H., and S. R. Kottegoda: A study of the vascular actions of 5-hydroxytryptamine, tryptamine, adrenaline and noradrenaline. Quart. J. exp. Physiol. **38**, 225 (1953).

[9] del Greco, F., G. M. C. Masson and A. C. Corcoran: Renal and arterial effects of serotonin in the anesthetized rat. Amer. J. Physiol. **187**, 509 (1956).

[10] Hotovy, R., and E. Roesch: Zur Pharmakologie der Kreislaufwirkung von 5-Hydrotryptamin. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 369 (1958).

[11] Konzett, H.: Neue broncholytisch hochwirksame Körper der Adrenalinreihe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **197**, 27 (1941).

[12] Konzett, H.: The effects of 5-hydroxytryptamine and its antagonists on tidal air. Brit. J. Pharmacol. **11**, 289 (1956).

[13] Konzett, H., u. R. Rössler: Versuchsanordnung zur Untersuchung an der Bronchialmuskulatur. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **195**, 71 (1940).

[14] Kottegoda, S. R., and J. C. Mott: Cardiovascular and respiratory actions of 5-hydroxytryptamine in the cat. Brit. J. Pharmacol. **10**, 66 (1955).

[15] Lindell, S.-E., and H. Westling: Potentiation by histaminase inhibitors of the blood pressure response to histamine in cats. Acta physiol. scand. **37**, 307 (1956).
[16] McCubbin, J. W., J. H. Green, G. C. Salmoiraghi and I. H. Page: The chemoreceptor stimulant action of serotonin in dogs. J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 191 (1956).
[17] Meier, R., H. J. Bein u. H. G. Kraft: Zur Charakterisierung der durch 5-Hydroxytryptamin bedingten Atemreaktion. Helv. physiol. Acta **14**, C74—C74 (1956).
[18] Meier, R., u. H. G. Kraft: Die Bedeutung der vagalen Atemphasenregulation für die Wirkung bronchoconstrictorischer Pharmaka. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 1 (1958).
[19] Natoff, J. L., and M. F. Lockett: The assay of histamine, 5-hydroxy-tryptamine, adrenaline, and noradrenaline, on the blood pressure of the fowl. J. Pharm. (Lond.) **9**, 464 (1957).
[20] Page, I. H.: Cardiovascular effects of serotonin, 5- and 7-hydroxy-tryptamine and tryptamine. Fed. Proc. **11**, 116 (1952).
[21] Page, I. H.: The vascular action of natural serotonin, 5- and 7-hydroxytryptamin and tryptamine. J. Pharmacol. exp. Ther. **105**, 58 (1952).
[22] Page, I. H.: Serotonin (5-Hydroxytryptamine). Physiol. Rev. **34**, 563 (1954).
[23] Page, I. H., and J. W. McCubbin: The variable arterial pressure response to serotonin in laboratory animals and man. Circulat. Res. **1**, 354 (1953).
[24] Page, I. H., and J. W. McCubbin: Arterial pressure response to infused serotonin in normotensive dogs, cats, hypertensive dogs and man. Amer. J. Physiol. **184**, 265 (1956).
[25] Reid, G.: Circulatory effects of 5-hydroxytryptamine. J. Physiol. (Lond.) **118**, 435 (1952).
[26] Salmoiraghi, G. C., J. W. McCubbin and I. H. Page: Effects of d-lysergic acid diethylamide and its brom derivative on cardiovascular response to serotonin and on arterial pressure. J. Pharmacol. exp. Ther. **119**, 240 (1957).
[27] Salmoiraghi, G. C., I. H. Page and J. W. McCubbin: Cardiovascular and respiratory response to intravenous serotonin in rats. J. Pharmacol. exp. Ther. **118**, 477 (1956).
[28] Schneider, J. A., and F. F. Yonkman: Action of serotonin (5-hydroxytryptamine) on vagal afferent impluses in the cat. Amer. J. Physiol. **174**, 127 (1953).
[29] Schneider, J. A., and F. F. Yonkman: Species differences in respiratory and cardiovascular responses to serotonin (5-hydroxytryptamine). J. Pharmacol. exp. Ther. **111**, 84 (1954).
[30] Weidmann, H., u. A. Cerletti: Untersuchungen über die pressorische Wirkung des 5-Hydroxytryptamin (Serotonin). Arch. int. Pharmacodyn. **111**, 98 (1957).

Dr. H. G. Kraft, Forschungslaboratorien der Ciba AG.,
Pharmazeutische Abteilung, Basel/Schweiz

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 432—438 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Aktivierung proteolytischer Fermente bei Entzündungsreaktionen*

Von

MARTIN KRAMER

(Eingegangen am 10. Juli 1958)

Vorangegangene Experimente über die pharmakologische Beeinflussung des Dextran- und Eiereiweißödem der Ratte, ließen auf verschiedene Entstehungsmechanismen dieser beiden anaphylaktoiden Reaktionen schließen. (KRAMER 1956a). Die Histaminfreisetzung im Gewebe kommt als wesentlicher auslösender Faktor für die Ödementstehung nicht in Frage (KRAMER 1956b) und kann auch für die Entwicklung der nekrotisierenden Entzündung nach lokaler Ricinapplikation nicht von entscheidender Bedeutung sein (KRAMER 1957, 1958). Für die Pathogenese des Dextranödems erwies sich in Untersuchungen von PARRATT u. WEST sowie HALPERN u. Mitarb. die Freisetzung von Serotonin, die von BHATTACHARYA u. LEWIS erstmalig gezeigt wurde, von hervorragender Bedeutung. Eigene Untersuchungen (ARRIGONI-MARTELLI u. KRAMER) bestätigten diese Befunde zum Teil, brachten aber andererseits das Ergebnis, daß zwischen der ödemhemmenden Wirkung und der Antiserotoninaktivität von 5 Phenothiazinderivaten keinerlei Zusammenhang festgestellt werden konnte.

Seit längerer Zeit werden von MENKIN für die Entstehung von echten Entzündungsreaktionen Polypeptide verantwortlich gemacht, die er aus entzündlichen Exsudaten isolierte und die bei intracutaner Injektion den Austritt von i.v. injiziertem Trypanblau aus den Capillaren und eine Leukocytenemigration bewirkten. Wahrscheinlich handelt es sich dabei nicht um einheitliche Substanzen, da SPECTOR gezeigt hat, daß zahlreiche Polypeptide von bestimmter Kettenlänge diese Reaktionen auszulösen vermögen.

Derartige Substanzen, die für die Entwicklung von anaphylaktoiden, anaphylaktischen oder „echten" Entzündungen ursächliche Bedeutung haben könnten, wie Serotonin, Histamin oder Polypeptide, entstehen möglicherweise durch eine den Entzündungsvorgang einleitende Proteolyse im Blut oder im Gewebe. Dieser Mechanismus gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch Befunde von UNGAR u. MIST (1949); UNGAR, DAMGAARD u. HUMMEL (1953), wonach im Meerschweinchenserum durch

* Ein Teil der Ergebnisse wurde auf der 21. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Saarbrücken vorgetragen.

Inkubation mit Antigen nach vorheriger Sensibilisierung oder mit anaphylaktoiden Stoffen z. B. Pepton, Agar oder mit Substanzen, die im angloamerikanischen Schrifttum als Histaminliberatoren bekannt sind, Profibrinolysin zum Fibrinolysin aktiviert wird. Die genannten Autoren zeigten ferner ein gleichzeitiges Auftreten von Histamin und proteolytischer Aktivität bei Zusatz von Antigen, Tween 20 oder Rinderfibrinolysin zu Lungenschnitten von Meerschweinchen und schlossen daraus, daß Histamin durch die Proteolyse freigesetzt wird. Die von ihnen veröffentlichten Kurven lassen jedoch eher vermuten, daß die beiden Vorgänge unabhängig voneinander ablaufen. In analoger Weise kann auch in Gewebsschnitten der Lunge eine proteolytische Aktivität induziert und gleichzeitig das Freiwerden von Histamin beobachtet werden. Die Autoren glauben an einen ursächlichen Zusammenhang von Proteolyse und Histaminfreisetzung, haben das jedoch nicht schlüssig bewiesen.

Diesen Experimenten und Schlußfolgerungen ist mehrfach widersprochen worden. Jemski, Flick u. Stinebring konnten die Ungarschen Befunde im Meerschweinchenserum nicht bestätigen. Das mag daran liegen, daß sie nicht optimale Dosen zur Aktivierung benutzt haben. McIntre, Roth u. Sproull sahen im tödlichen anaphylaktischen Schock des Kaninchens keine Erhöhung der proteolytischen Aktivität, wohl aber nach Injektion von Streptokinase, die wiederum von den Tieren reaktionslos vertragen wurde. Sie lehnen eine allgemeine Bedeutung dieser Hypothese einer Serumpreoteaseaktivierung deshalb ab.

Weitere Veröffentlichungen von Ungar, in denen die Hemmung der Fibrinolysinaktivität durch Antirheumatica wie Na-Salicylat und Aminophenazon beschrieben ist, veranlaßten erneut, nach Zusammenhängen zwischen Proteaseaktivität und Entzündung zu suchen. Darüber hinaus sollte die Wirkungsweise der Ricins untersucht werden. Moulé hatte festgestellt, daß Ricin selbst proteolytische Eigenschaften besitzt und hatte mit diesen die entzündungserregende Wirkung erklärt. Mit dem Absterben vom Gewebe oder dem „Einschmelzen" eines entzündeten Gebietes sind immer durch freiwerdendes Kathepsin autolytische Vorgänge vergesellschaftet. Dieses Ferment (p_H Optimum 4,5) sollte zunächst nicht berücksichtigt werden, weswegen die Untersuchungen mit isotonischem Phosphatpuffer vom p_H 7,4 durchgeführt wurden, bei dem Fermente vom Typ des Fibrinolysins (oder Trypsins) erfaßt werden.

Material und Methoden

Zur Gewinnung von Meerschweinchenserum wurde an mehreren Tieren eine Herzpunktion vorgenommen und das erhaltene Blut zentrifugiert.

Anfänglich wurde eine 6%ige Dextran-Lösung der Firma Benger in Verdünnungen mit 0,15 Mol Phosphatpuffer (p_H 7,4) benutzt. In allen anderen Versuchen kam eine einheitliche Dextranfraktion (Mol.-Gew. 97000) zur Anwendung[1].

Ovomucoid[2] war nach dem Verfahren von Frédéricq u. Deutsch hergestellt worden. Bei der Aktivierung und Ausfällung des Fibrinolysins wurde nach den Angaben von Ungar u. Mist vorgegangen. Zur Bestimmung der Aktivität wurde anfänglich die „Clot-prevention" Methode von Ungar u. Mist benutzt, später die

[1] Ich danke der Wissenschaftlichen Abteilung der Firma Knoll A.G., Ludwigshafen, für die freundliche Überlassung einheitlicher Dextranfraktionen.

[2] Herrn Prof. Dr. O. Westphal, Wander A.G. danke ich für die freundliche Überlassung von kristallinem Ovomucoid.

Messung der UV-Absorption der Überstehenden nach Fällung mit Trichloressigsäure bei 285 m nach Paulitschko, Kaiser u. Andres. Als Substrat diente Fibrinogen[1] oder Humanalbumin. Nach der Methode von Ungar u. Mist wird diejenige proteolytische Aktivität als eine Einheit bezeichnet, die die Gerinnung von 0,2 ml einer 0,2%igen Fibrinogenlösung gerade noch verhinderte.

Reines Ricin wurde im hiesigen Institut von Schöne isoliert. Bei den Versuchen zur Aktivierung des Serumprofibrinolyssin wurde in den meisten Fällen auch die Aktivierung durch Streptokinase geprüft, um die Anwesenheit der Fermentvorstufe nachzuweisen. In den geprüften Fermentlösungen wurden Stickstoffbestimmungen durchgeführt und die Aktivität auf Milligramm N bezogen.

Ergebnisse

1. Aktivierung von Profibrinolysin durch Ovomucoid und Dextran

Tab. 1 zeigt die fibrinogenolytische Aktivität nach 2 min langer Inkubation von Meerschweinchenserum mit Pepton, Dextran und Ovomucoid. Durch Ovomucoid wurde eine deutliche Aktivierung erzielt, Pepton war bei der angewandten Dosis wenig wirksam. Dextran war unwirksam und hemmte in einigen Versuchen die spontane Aktivierung.

Tabelle 1. *Fibrinogenolytische Aktivität* E/ml Serum (nach Ungar u. Mist)

	Pepton 20 mg/ml Serum	Dextran 30 mg/ml Serum	Ovomucoid 20 mg/ml Serum	Kontrolle
1	0	0	83	30
2	20	0	20	5
3	20	10	70	0
4	70	50	200	50
5	20	5	50	0
6	25	0	63	18
	Stickstoffgehalt der Fermentlösung mg/ml Serum			
5	0,28	0,29	0,39	0,38
6	0,39	0,27	0,39	0,32

Stickstoffbestimmungen in den Fermentlösungen bei den letzten beiden Versuchen ergaben, daß die ausgefällten Proteinmengen etwa in der gleichen Größenordnung lagen.

Bei den folgenden Proteaseaktivitätsmessungen mit der Methode von Paulitschko u. Mitarb. wurde zunächst eine Eichkurve mit Trypsin angefertigt, bei der Humanalbumin als Substrat diente. Bis zu etwa 200 μg Trypsin fand sich eine lineare Abhängigkeit der Zunahme der optischen Dichte von der Fermentmenge. Durch Ovomucoid konnte die

[1] Die Firma Hoffmann-La Roche stellte reines Fibrinogen in dankenswerter Weise zur Verfügung.

proteolytische Aktivität des Trypsins erheblich gehemmt, aber nicht aufgehoben werden (Tab. 2). Dieses Beispiel wurde durch mehrere weitere Versuche mit anderen Konzentrationen bestätigt. Die Eigenschaft des Ovomucoids als Trypsininhibitor ist bekannt. Es hemmt ferner die Katalase (Mutolo u. Abrignani). Bei den in vitro Versuchen wurde das Ovomucoid nach erfolgter Aktivierung von dem Ferment durch Ausfällung desselben abgetrennt. In vivo bleibt das Ovomucoid mit dem Ferment in Kontakt und kann als Proteaseinhibitor wirken. Es ist daher fraglich, ob die in vitro gefundene Proteaseaktivierung in vivo überhaupt eine Rolle spielen kann.

Tabelle 2

Aussatz (1 Std)	Bei 285 mμ
460 μg N-Trypsin	330
460 μg Trypsin + 450 μg Ovomucoid	75
460 μg N-Trypsin + 4,5 mg Ovomucoid	75

Tab. 3 zeigt einige Beispiele, bei denen ebenfalls Serumalbumin als Substrat verwendet wurde. In diesen Versuchen waren die Streuungen (verschiedene Proteinfällung, verschiedene normale Aktivität und schließlich Streuung der Aktivierungsgröße) so groß, daß die Unterschiede

Tabelle 3. *Ausgewählte Ergebnisse bei Inkubation von 3 ml Meerschweinchenserums für 2 min mit verschiedenen Substanzen (Substrat im Proteolyseversuch 2 ml 1,5%iges Humanalbumin, Ein. Zeit 1 Std)*

	Substanz	Dosis ml Serum	N-Gehalt des gefällten Globulins	E. E.	E. E./ mg N
Versuch A	Kontrolle		340 μg	9	27
	Streptokinase	5000 E	340 μg	25	74
	Ovomucoid	300 μg	350 μg	17	49
	Ovomucoid	3,0 mg	390 μg	17	44
	Dextran	300 μg	370 μg	27	74
Versuch B	Kontrolle		400 μg	2	5
	Ovomucoid	100 μg	350 μg	8	23
	Dextran	100 μg	420 μg	13	31

nicht signifikant waren. Es zeigte sich, daß sowohl Ovomucoid als auch Dextran die eiweißspaltende Eigenschaft im Meerschweinchenserum verstärkt. Möglicherweise ist die im „clot-prevention-test" gefundene Unwirksamkeit des Dextrans methodisch begründet. An der Benutzung von Albumin als Substrat bei der Methode von Paulitschko u. Mitarb. kann der Unterschied nicht liegen, denn das grundsätzlich gleiche Ergebnis hatten Versuche, bei denen Fibrinogen als Substrat verwandt wurde. Besonders zuverlässig war die aktivierende Wirkung des Ovomucoids in höheren Dosen zu reproduzieren.

In Katzenserum, das zum Vergleich untersucht wurde, konnte weder mit Dextran noch mit Ovomucoid eine Aktivierung nachgewiesen werden, obwohl auch dort Profibrinolysin vorhanden ist.

Die Euglobulinfraktion des Rattenserums zeigt weder im clot-prevention-test, noch mit den auf der Erhöhung der UV-Absorption beruhenden Methoden irgendeine proteolytische Aktivität nach Inkubation mit Dextran, Ovomucoid oder Streptokinase. Dieser Befund bestätigt Ergebnisse von Cliffton u. Cannamela, die ebenfalls Rattenserum mit Strepto- oder Staphylokinase kaum oder gar nicht aktivieren konnten.

Intravenöse Injektionen hoher Dosen Streptokinase riefen an Ratten keinerlei Erscheinungen hervor. Die anaphylaktoiden Reaktionen der Ratte nach Dextran oder Ovomucoid beruhen nach den erhaltenen Ergebnissen nicht auf einer Aktivierung des Serumprofibrinolysins. In diesem Zusammenhang sind Befunde von Beiler, Brendel u. Kleinberg sehr interessant, die sowohl das Eieralbumin- wie das Dextranödem durch Injektion von Trypsin oder Chymotrypsin verhindern konnten. Diese Wirkung trat auch bei adrenalektomierten Tieren ein. Der Wirkungsmechanismus ist ungeklärt, dennoch ist es wahrscheinlich, daß er mit der proteolytischen Eigenschaft beider Fermente in Zusammenhang steht. Dieser Befund spricht ebenfalls sehr dagegen, daß die anaphylaktoiden Reaktionen der Ratte nach Dextran oder Eieralbumin durch die Aktivierung einer Protease entstehen.

2. Proteolyse bei der Ricinnekrose

Pfotenhaut von normalen Ratten wurde in 0,15 m Phosphatpuffer p_H 7,4 homogenisiert und filtriert. Vom Filtrat wurden je 3 ml mit Puffer (Kontrolle), mit 100 μg Ricin und mit 300 μg Ovomucoid I Std inkubiert. Dann wurde von jeder Lösung je 1 nl mit 2 ml 1%iger Fibrinogenlösung (p_H 7,4) 2 Std inkubiert. Das Ergebnis zeigt Tab. 4. Ricin bewirkt eine Verstärkung der proteolytischen Aktivität, während Ovomucoid auch im

Tabelle 4

Ansatz	N-Gehalt des Pfotenhautextraktes	E. E.	E. E./mg N
Kontrolle	430 μg N	48	111
Ink. mit 100 μg Ricin	430 μg N	60	140
Ink. mit 300 μg Ovomucoid	430 μg N	20	47

Hautextrakt bei p_H 7,4 aktive Proteasen eindeutig hemmt. Die Aktivität eines Extraktes aus Pfoten, in die 2 Tage vorher 0,5 μg Ricin/Pfote injiziert war, betrug nur 14 EE/mg N, war also deutlich geringer. Moll hat in Versuchen an Affen gezeigt, daß nach intramuskularen Terpentinölinjektionen, die eine starke Entzündung hervorrufen, der Antifibrinolysintiter im Serum erheblich ansteigt. Das Maximum ist nach 48 Std

erreicht. Möglicherweise gilt dies auch für die Ratte und könnte die geringere proteolytische Aktivität des Extraktes aus entzündeter Haut erklären, falls die Annahme zulässig ist, daß die Antifibrinolysinkonzentration auch in Gewebe ansteigt.

In mehreren Versuchen wurde geprüft, ob die Inkubation der Filtrate von Muskelhomogenat mit verschiedenen Ricinkonzentrationen zu einer Steigerung der proteolytischen Aktivität gegenüber den Substraten Fibrinogen oder einem Fibrinhomogenat führt. Die Frage konnte eindeutig negativ beantwortet werden. Ebenso war die proteolytische Aktivität eines Extraktes aus nekrotischer Muskulatur, in die 6 Tage vorher Ricin in vivo injiziert worden war, gegenüber Fibrin und Fibrinogen nicht stärker als die von Extrakten normaler Muskeln. Dagegen betrug die UV-Absorption pro Milligramm N des Extraktes nach Fällung mit Trichloressigsäure 170 EE/mg N und die eines normalen 93 EE/mg N, gemessen gegen aqua dest.

In einem weiteren Versuch wurden 10 μg und 100 μg Ricin mit 1 oder 2 ml eines Extraktes aus normaler Muskulatur 2 Std inkubiert, anschließend mit Trichloressigsäure gefällt und im Überstehenden die UV-Absorption bei 285 m gemessen. Das Ergebnis zeigt Tab. 5.

Tabelle 5

	Ansatz	EE	EE/ mg N
2 ml Extr.	(3,28 mg N) + 100 μg Ricin + 1 ml Puffer	363	110
1 ml Extr.	(1,64 mg N) + 100 μg Ricin + 2 ml Puffer	210	128
2 ml Extr.	(3,28 mg N) + 10 μg Ricin + 1 ml Puffer	425	129
1 ml Extr.	(1,64 mg N) + 10 μg Ricin + 1 ml Puffer	210	128
2 ml Extr.	(3,28 mg N) + 2 ml Puffer	340	102
1 ml Extr.	(1,64 mg N) + 1 ml Puffer	168	101

Hier läßt sich eine geringe Aktivierung von Proteasen bei p_H 7,4 durch Ricin im Muskelextrakt erkennen. Ob es sich bei den Versuchen mit Gewebshomogenaten um eine echte Aktivierung oder um Inaktivierung von Inhibitoren handelt, kann nicht entschieden werden.

Mit beiden benutzten Methoden der Proteolysemessung hat sich eine eigene proteolytische Wirkung des Ricins nicht nachweisen lassen. Die Befunde von Moulé werden daher nicht bestätigt.

Bei nekrotisierenden Entzündungen wie sie durch Ricin hervorgerufen werden, sind Proteasen mit einem p_H-Optimum von 7,4 sicher von Bedeutung. Nach längerer Inkubationszeit (30 min) bewirkt Ricin auch im Meerschweinchenserum eine Verstärkung der proteolytischen Aktivität.

In der Bedeutung der Proteasen liegt ein weiteres Unterscheidungsmerkmal gegenüber den anaphylaktoiden Reaktionen nach Dextran und Ovomucoid, die wohl nicht als echte Entzündungen zu werten sind.

Summary

1. Guinea pig serum profibrinolysin (plasminogen) is activated in vitro by dextran and ovomucoid.

2. In cat and rat serum, activation of proteolytic enzymes takes place neither by dextran or ovomucoid nor by streptokinase.

3. Incubating ricin with tissu extracts, it is possible under determined conditions to show an increased proteolytic activity.

4. From the results is concluded that the activation of a protease, active on the p_H range of 7,4 as trypsin or fibrinolysin, can not be the cause for the appearence of the dextran or ovomucoide dema of rats, but may have some fundamental meaning for the genesis of the ricin necrosis.

Literatur

Arrigoni-Martelli, E., u. M. Kramer: Boll. Soc. Sci. Biol. (im Druck).

Beiler, J. M., R. Brendel and J. Martin: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **89**, 274 (1955).

Bhattacharya, B. K., and G. P. Lewis: Brit. J. Pharmacol. **11**, 202 (1956).

Cliffton, E. E., and D. A. Cannamela: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **77**, 305 (1955).

Cohen, H., M. Graff and W. Kleinberg: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **88**, 517 (1955).

Frédéricq, E., et H. F. Deutsch: J. biol. Chem. **181**, 499 (1949).

Haining, C. G.: Brit. J. Pharmacol. **11**, 107 (1956).

Halpern, B. N., P. Liacopoulous et M. Liacopoulous-Briot: C. R. Soc. Biol. (Paris) **151**, 1661, 1692 (1957).

Jemski, J. V., J. A. Flick and W. R. Stinebring: J. exp. Med. **97**, 439 (1953).

Kramer, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 302 (1956a); **228**, 340 (1956b); **232**, 320 (1957); **233**, 125 (1958).

McIntire, F. C., L. W. Roth and M. Sproull: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **73**, 605 (1950); **81**, 691 (1952).

Menkin, V.: Int. Arch. Allergy **4**, 131 (1953). — Biochemical Mechanism in Inflammation. Springfield, Illinois: Thomas 1956.

Moll, F. C.: J. exp. Med. **103**, 363 (1956).

Moulé, Y.: Arch. Sci. Physiol. **5**, 227 (1951).

Mutolo, V., e F. Abrignani: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **30**, 397 (1954).

Parratt, J. R., e G. B. West: J. Physiol. **135**, 10 P, 24 P (1957).

Paulitschko, M., E. Kaiser u. H. Andres: Biochem. Z. **322**, 526 (1952).

Schöne, D.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 233 (1958).

Spector, W. G.: J. Path. Bact. **63**, 93 (1951).

Ungar, G., and S. H. Mist: J. exp. Med. **90**, 39 (1949).

Ungar, G., E. Damgaard and F. P. Hummel: Amer. J. Physiol. **171**, 545 (1952). — J. exp. Med. **98**, 291 (1953).

Ungar, G., and E. Damgaard: J. exp. Med. **101**, 1 (1955).

Dr. Martin Kramer, Soc. Ital. Prodotti Schering, Mailand/Italien, Via Mancinelli 7

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 439—447 (1958)

Aus den Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena

Über den Glutathiongehalt des Thymus von Ratten unter Einwirkung von Steroidhormonen

Von

J. Gebhard, F. Hohensee und T. Kusch

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 8. Juli 1958)

Die ältere Literatur über die Thymusdrüse hat Tesseraux (1953) kürzlich zusammengefaßt. Die endokrine Funktion des Organs ist bis heute noch unsicher. Auch neuere Arbeiten (z. B. Goslar) konnten die Problematik nur teilweise klären. Für die vorliegende Fragestellung ist von Interesse, daß die von Rowntree et al. dargestellten Extrakte in erheblichem Umfange Glutathion enthielten. Einige der Wirkungen, welche einem Thymushormon zugeordnet wurden, konnten — wie später gezeigt wurde — durch die Applikation von Glutathion (GSH) imitiert werden (Schaffer et al., Steinberg). Unter allgemeinen Gesichtspunkten wurden die Probleme des Glutathionstoffwechsels in der letzten Zeit ebenfalls zusammengefaßt (Colowick et al. 1954); die ersten Befunde über den GSH-Gehalt des Thymus wurden von Uhlenbrook mitgeteilt.

Ein weiterer Gesichtspunkt zur vorliegenden Fragestellung war der bekannte Einfluß von Steroidhormonen auf das lymphatische Gewebe, welcher in Form der Thymusinvolution als ein methodisch einfaches und brauchbares Testverfahren häufig Anwendung findet. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen an der Ratte wurden in letzter Zeit erneut von Shewell gründlich untersucht. Die allgemeinen Wechselwirkungen zwischen Thymus und Nebennieren hat Comsa eingehend behandelt.

Wir stellten uns die Aufgabe, nach einem Überblick über die Beziehungen zwischen GSH und Thymus unter normalen Bedingungen zu untersuchen, in welchem Umfange der GSH-Gehalt in diesem Organ von der Einwirkung von Steroidhormonen abhängig ist, und ob diese Regulationen von der Art des angewendeten Steroides beeinflußt werden.

Methodik

Es wurden weiße Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts aus langjähriger Inzucht verwendet. GSH wurde nach der Methode von Schroeder u. Woodward (1939) bestimmt, auch GSSG wurde nach der Glyoxalase-Methode gemessen. Blindversuche mit Thymusbrei und Methylglyoxal ergaben keine Anhaltspunkte für Besonderheiten der Umsetzung. Die Tiere wurden mit einer Standard-Plätzchen-Kost (modifiziert nach Lembeck) ernährt und 5 Tage lang vor Versuchsbeginn an die Laboratoriumsbedingungen adaptiert. Die Adrenalektomie erfolgte einzeitig in Äthernarkose, die Entfernung der Gonaden am gleichen Tage. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und die Organe sofort zur Verarbeitung entnommen. Die verwendeten Steroide entsprachen den üblichen Reinheitsanforderungen und wurden in Äthanol/Wasser als feine Suspension appliziert. Die statistische Aufarbeitung der Befunde erfolgte nach den bekannten Verfahren (zusammengestellt bei E. Weber).

Versuchsergebnisse

1. Die Beziehungen zwischen Thymusgewicht und Körpergewicht an Normaltieren

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und Körpergewicht an normalen Ratten beider Geschlechter. Die Regressionsgeraden für männliche und weibliche Tiere liegen in befriedigender Übereinstimmung parallel zueinander, so daß grundsätzliche geschlechtsspezifische Unterschiede nicht anzunehmen sind. Die Regressionsgerade für weibliche Tiere ist etwas nach oben verschoben, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Der lineare Zusammenhang bricht bei einem gewissen Körpergewicht ab. Diese Umschlagspunkte lagen bei unserem Tiermaterial für

♂ bei 160—180 g Körpergewicht und für

♀ bei 120—130 g Körpergewicht.

Jenseits der Umschlagspunkte, d. h. bei einem Gesamtgewicht von $>$ 180 g ♂ bzw. $>$ 130 g ♀ besteht keine Korrelation mehr zum Thymusgewicht.

Die Festlegung dieser Verhältnisse an unserem Tiermaterial war notwendig, weil Birmingham u. Desbarats gezeigt hatten, daß verschiedene Laboratoriumsratten sich hier durchaus unterschiedlich verhalten. Long-Evans-Ratten waren ungeeignet, während männliche Sherman-Ratten ebenfalls lineare Beziehungen zwischen Körpergewicht und Thymusgewicht zeigten.

Unser Tiermaterial haben wir im Hinblick auf die späteren Versuche in empirische Gewichtsklassen eingeteilt, welche jedoch untereinander wie auch zwischen den Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede zeigen. Das Material ist, in Tab. 1 zusammengefaßt, dargestellt.

Da der Korrelationskoeffizient und die Regression jedoch nur eine Aussage über die Linearität und die Richtung variabler Größen gestatten, schien es nützlich, für weitere Vergleiche auch den Mittelwert und dessen

Tabelle 1
Korrelationen zwischen Thymusgewicht und Körpergewicht an normalen Ratten

	Körpergewicht	N	r	α	Regression
♂	bis 80 g	18	0,8974	67,1°	$y = 2{,}37x + 18{,}0$
	bis 100 g	24	0,8828	70,5°	$y = 2{,}83x + 3{,}7$
	bis 130 g	31	0,8910	69,7°	$y = 2{,}70x + 8{,}8$
	bis 180 g	35	0,9105	67,8°	$y = 2{,}45x + 21{,}7$
♀	bis 80 g	25	0,7652	65,8°	$y = 2{,}23x + 58{,}2$
	bis 100 g	39	0,8323	66,3°	$y = 2{,}27x + 56{,}0$
	bis 130 g	52	0,8798	69,8°	$y = 2{,}71x + 33{,}5$

Prüfung gegen die Nullhypothese durch den t-Test heranzuziehen. Das mittlere Thymusgewicht von normalen männlichen Ratten der Gewichtsklasse von 30—80 g betrug in Milligramm:

$$\bar{x} = 131{,}0 \text{ mg } (s = 48{,}0;\ N = 8) \text{ und}$$
$$\bar{x} = 273{,}0 \text{ mg } (s = 79{,}0;\ N = 12) \text{ in}$$

der Gewichtsklasse von 80—130 g. Bei weiblichen Tieren fanden wir bei gleicher Klasseneinteilung:

$$\bar{x} = 169{,}0 \text{ mg } (s = 47{,}0;\ N = 23) \text{ und}$$
$$\bar{x} = 299{,}0 \text{ mg } (s = 66{,}0;\ N = 13).$$

Neben dem Anstieg des Thymusgewichtes mit zunehmendem Körpergewicht zeigen diese Ergebnisse, daß ein Unterschied des mittleren Thymusgewichtes auch bei gleichen Gewichtsklassen innerhalb der Geschlechter nicht errechenbar ist. Hiermit bestätigen wir die Befunde von Bruce et al., welche keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt haben. Das absolute Thymusgewicht unserer Versuchstiere beider Geschlechter erreichte maximal etwa 400 mg.

2. Die Beziehungen zwischen Körpergewicht, Thymusgewicht und GSH-Gehalt des Thymus

Der mittlere GSH-Gehalt des Thymus (in Mikrogramm berechnet auf 100 mg Frischgewicht des Thymus) ist in der Tabelle innerhalb der Gewichtsklassen zusammengestellt (Tab. 2).

Tabelle 2. *Mittel des Glutathion in der Thymusdrüse in µg berechnet auf 100 mg Thymusfrischgewicht*

	♂ Gewichtsklassen			♀ Gewichtsklassen		
	80—100 g	80—130 g	bis 180 g	80—100 g	80—130 g	bis 130 g
m	83,6	82,8	83,1	81,4	81,2	81,2
s	5,5	5,2	5,9	1,1	1,2	1,2
N	10	12	35	8	13	15

Es ergibt sich, daß der GSH-Gehalt weiblicher Tiere geringfügig aber nicht signifikant niedriger ist. Aber auch zwischen den Gewichtsklassen sind die Unterschiede des GSH-Gehaltes bei der Berechnung auf das

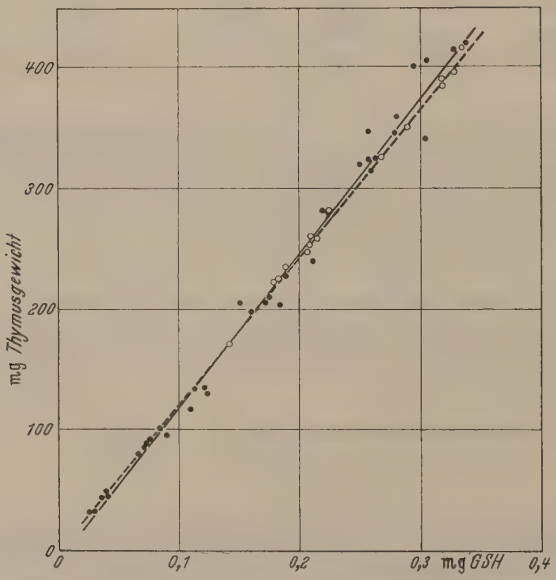


Abb. 1. Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und Thymus-GSH. • männliche Tiere bis 180 g Körpergewicht; —— Regression $y = 1{,}29\,z - 9{,}8$, $N = 35$, $r = 0{,}993$, $\alpha = 52{,}2°$; ∘ weibliche Tiere bis 130 g Körpergewicht; - - - Regression $y = 1{,}24\,z - 1{,}2$, $N = 15$, $r = 0{,}9981$, $\alpha = 51{,}2°$

Thymusgewicht unter den einheitlichen Versuchsbedingungen an Normaltieren nicht sehr groß[1]. Die vorstehend geschilderten Zusammenhänge

[1] Der Gehalt an GSSG war in allen Fällen (58) sehr niedrig, teilweise (32 Tiere) überhaupt nicht meßbar. Zwischen den Geschlechtern bestanden ebenfalls keine Unterschiede. Der mittlere GSSG-Anteil betrug — an 58 Tieren gemessen — 2,2% der mittleren GSH-Menge. Da sich diese Verhältnisse auch nach der Adrenalektomie nicht deutlich veränderten, der mittlere GSSG-Gehalt betrug hier 1,4% (7 Versuche) der GSH-Menge, begnügten wir uns bei den weiteren Versuchen mit einer gelegentlichen Kontrolle des GSSG.

zwischen Thymusgewicht und GSH werden aus der Abbildung deutlich (Abb. 1).

Die Beziehungen zum GSH-Gehalt des Thymus ergeben bei einfacher Korrelationsrechnung einen engen Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und absolutem GSH-Gehalt der Drüse (siehe Tab. 3).

Die Meßpunkte, wie in der Abb. 1 dargestellt, liegen nahezu auf einer Geraden. Eine im Anschluß daran durchgeführte partielle Korrelationsrechnung zeigte, daß der Einfluß des Körpergewichtes auf den korrelativen

Tabelle 3

Korrelationen zwischen Körpergewicht, Thymusgewicht und GSH des Thymus[1]

	♂				♀	
	bis 80 g	bis 100 g	bis 130 g	bis 180 g	bis 100 g	bis 130 g
N	18	24	30	35	10	16
r_{xy}	0,8974	0,8828	0,8792	0,9105	0,6581	0,8189
r_{yz}	0,9951	0,9960	0,9950	0,9932	0,9975	0,9981
$r_{yz \cdot x}$	0,9750	0,9839	0,9778	0,9596	0,9956	0,9959

[1] r Korrelationskoeffizient; x Körpergewicht; y Thymusgewicht; z GSH des Thymus.

Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und GSH-Gehalt unwesentlich ist. Dieses Ergebnis scheint durch die recht gute Übereinstimmung der einfachen und partiellen Korrelationskoeffizienten r_{yz} und $r_{yz \cdot x}$ (Korrelation unter Ausschaltung des Körpergewichtes) bestätigt. Wir finden weiter, daß der enge Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und Körpergewicht, welcher bis zu einem bestimmten Körpergewicht vorhanden ist, offensichtlich auf einen anderen Mechanismus zurückzuführen ist als der ebenfalls sehr enge Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und GSH-Gehalt der Thymusdrüse. Denn diese letztgenannte Beziehung bleibt auch dann noch praktisch unverändert bestehen, wenn mit der Zunahme des Körpergewichtes der erstgenannte Zusammenhang nicht mehr besteht. Bei ♂ Tieren mit einem Gewicht von über 180 g fanden wir nämlich einen Korrelationskoeffizienten $r_{yz} = 0{,}9833$. Die Annahme zweier voneinander unabhängiger Mechanismen wird durch die Korrelationskoeffizienten an adrenalektomierten Tieren weiter bestätigt. Nach der Adrenalektomie ist eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht und dem Thymusgewicht überhaupt nicht mehr nachweisbar ($r_{xy} = 0{,}1477$), während der korrelative Zusammenhang zwischen Thymusgewicht und Thymus — GSH mit $r_{yz} = 0{,}9770$ in unveränderter Stärke — unabhängig vom Geschlecht der Tiere — weiter erhalten bleibt.

3. Die Veränderungen des Thymus-GSH durch Steroidhormone

Alle Steroidhormone verändern den GSH-Gehalt des Thymus signifikant, wobei die NNR-Hormone das durch Adrenalektomie verminderte GSH in die Größenordnung des Normalbereiches ansteigen lassen. Wir haben unsere Befunde in der Tab. 4 zusammengestellt und bei einigen vergleichbaren Gruppen die Prüfung gegen die Nullhypothese (*t*-Test) mit angegeben. Wenn man die hormonale Aktivität der NNR-Hormone als Bezugsgröße zugrunde legt, erkennt man, daß deutliche Unterschiede auch innerhalb dieser Gruppe bestehen. Das vorwiegend auf den Mineralstoffwechsel wirksame DOC scheint bei gleicher Dosierung wirksamer als das Glucocorticoid Cortison. Beide sind jedoch sicher wirksamer als Prednison, welches mit 1 mg/100 g in Beziehung zur hormonalen Wirkung relativ höher dosiert wurde als die vorstehend genannten Substanzen mit 2 mg/100 g Körpergewicht (Tab. 4).

Hiervon abweichende und offensichtlich besondere Verhältnisse scheinen hinsichtlich der Sexualhormone vorzuliegen. Die Zuführung von Methyltestosteron (2 mg/100 g) an männliche adrenalektomierte Tiere, wie auch die Gabe von Oestradiol (2 mg/100 g) an nebennierenlose Weibchen vermindern den GSH-Gehalt des Thymus signifikant. Überraschend ist nun, daß dies in gleicher Weise auch durch Kastration von Tieren beider Geschlechter erzielt werden kann. Wenn wir der allgemeinen Lehrmeinung folgend, die Entfernung der Gonaden als einen Eingriff ansehen, welcher zumindest vorwiegend durch den Ausfall der Produktion von Sexualhormonen gekennzeichnet ist, können wir feststellen, daß sowohl die Erhöhung als auch die Herabsetzung der im Organismus wirksamen Mengen der Sexualhormone Testosteron und Oestradiol, im gleichen Sinne wirkend, eine Verminderung des Thymus-GSH verursachen.

Für alle Versuche mit NNR- und Sexualhormonen haben wir die Regressionen berechnet. Wir finden dabei, daß es sich bei den beobachteten Veränderungen des Thymus-GSH in jedem Falle um eine Parallelverschiebung zu den Kontrollgruppen handelt. Da per definitionem die Regression ein Ausdruck für den Zusammenhang von zwei Meßgrößen ist, kann eine parallele Verschiebung unter dem Einfluß einer zugefügten Substanz als ein indirekter Beweis für die unmittelbare Wirkung derselben angesehen werden.

Die vorstehend geschilderten Befunde basieren alle auf der allgemein üblichen Ausdrucksweise, Meßwerte in mg-% anzugeben. Diese konventionelle Verfahrensweise würde jedoch allein angewendet, nur einen Teil der beobachteten Veränderungen erklären können, da hierbei die bekannte Wirkung der Steroide zur Thymusinvolution unberücksichtigt bliebe

Tabelle 4. *GSH-Gehalt des Thymus adrenalektomierter Ratten der Gewichtsklasse von 80—130 g*

Gruppe Nr.	Geschlecht	Zeit[1]	Behandlung	GSH[2]	s	N	Signifikanz[3] (verglichene Gruppen)	Mittelwerte	
								Thymus[5]	GSH[6]
1	♂	Kontrolle	nicht adrenalektomiert	82,8	5,24	12	$\approx$ (2)	273,0	226,0
2	♀	Kontrolle	nicht adrenalektomiert	81,2	1,16	13	$\approx$ (1)	299,0	242,1
3	♂	24 Std	ohne	75,5	3,26	7	$\approx$ (4); $<$ (1)	241,0	182,0
4	♀	24 Std	ohne	75,3	2,86	15	$\approx$ (3); $<$ (2)	304,0	229,0
5	♂	144 Std	Lösungsmittel[4]	77,4	1,94	19	$\approx$ (3); $\approx$ (6)	350,4	271,5
6	♀	144 Std	Lösungsmittel[4]	74,6	2,64	15	$\approx$ (4); $\approx$ (5)	355,5	265,7
7	♂	144 Std	Methyltestosteron 2 mg/100 g	73,0	2,24	12	$<$ (1); $<$ (5)	328,5	240,0
8	♀	144 Std	Oestradiol 2 mg/100 g	72,9	1,4	7	$<$ (2); $\approx$ (6)	285,1	207,8
9	♀	144 Std	Cortisonacetat 2 mg/100 g	81,8	2,1	7	$\approx$ (2); $>$ (6)	202,0	164,8
10	♀	144 Std	Prednison 1 mg/100 g	76,8	1,24	10	$<$ (2); $>$ (6)	164,7	126,8
11	♀	144 Std	DCA 2 mg/100 g	83,2	2,23	9	$\approx$ (2); $>$ (6)	424,8	349,0
12	♀	168 Std	Kastration[1]	69,9	1,1	7	$<$ (2)	417,0	291,5
13	♂	168 Std	Kastration[1]	69,2	0,8	7	$<$ (1)	358,1	247,1

[1] Zeit: Abstand der GSH-Bestimmung von der Adrenalektomie. Kastration und Adrenalektomie erfolgte gleichzeitig.
[2] GSH in Mikrogramm umgerechnet auf 100 mg Thymus-Frischgewicht.
[3] Prüfung mit t-Test.
[4] Lösungsmittelzusammensetzung: 19,2% Äthanol in Aqua bidest.
[5] Thymusfrischgewicht in Milligramm.
[6] Thymus-GSH in Mikrogramm.

Wir haben daher in den letzten beiden Spalten der Tab. 4 auch die Mittelwerte der Thymusgewichte und des Thymus-GSH angegeben. Diese Darstellung ermöglicht nun einen — wie wir glauben — genaueren Einblick in durchaus unterschiedliche Regulationsmechanismen. Bei den Corticoiden (DCA, Cortison, Prednison) beobachteten wir gleichmäßig eine Erhöhung des GSH in Richtung auf den Normalbereich hin. Offenbar wird dieses Ziel aber auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht. Die Glucocorticoide Cortison und Prednison kompensieren die bekannte Involution des lymphatischen Gewebes, welches sich in der Verminderung des Thymusgewichtes zeigt, durch eine relative Vermehrung der GSH-Menge des Thymus. Die absolute Zunahme des Thymusgewichtes unter DCA dagegen ist mit einer relativ kleineren Vermehrung des GSH gekoppelt, daß durch einen anderen Mechanismus ebenfalls die Normalisierung der GSH-Menge in dem Thymus erreicht wird. Ähnliche Unterschiede finden wir bei der Verminderung des Thymus-GSH durch Kastration bzw. durch die Gabe von Sexualhormonen. Die Kastrationsfolgen sind durch eine Vergrößerung des Thymusgewichtes gekennzeichnet, welche gekoppelt mit einer stärkeren, relativen Verminderung des GSH-Anteils zum Absinken des Gesamt-GSH führen. Oestradiol und Testosteron verändern das Thymusgewicht dagegen nicht, die Verminderung des Gesamt-GSH in dem Thymus kommt hier lediglich durch eine Verkleinerung des relativen GSH-Anteils zustande.

Zusammenfassung

Der GSH-Gehalt des Thymus und dessen Veränderungen wurden an normalen und adrenalektomierten Ratten beider Geschlechter untersucht und dazu die Beziehungen zum Thymusgewicht und Körpergewicht dargestellt.

Durch die Einwirkung von NNR- und Sexualhormonen wie auch nach Adrenalektomie und Kastration werden Veränderungen im GSH-Gehalt des Thymus hervorgerufen, welche auf unterschiedlichen Mechanismen beruhend, als spezifisch aufgefaßt werden.

Diese Veränderungen werden als unabhängig von der Involution des lymphatischen Gewebes gedeutet; deshalb wird ein teilweise selbständiger Regulationsmechanismus für das Glutathion in dem Thymus angenommen.

Literatur

Birmingham, M. K., and M.-L. Desbarats: Canad. J. med. Sci. **30**, 494 (1952).

Bruce, H. M., A. S. Parkes and W. L. M. Perry: Lancet **1952**, 790.

Colowick, S., A. Lazarow, E. Racker, D. R. Schwarz, E. Stadtman and H. Waelsch: Glutathione. New York 1954.

Comsa, J.: Nature (Lond.) **179**, 872 (1957).

Comsa, J., and H. Leroux: J. Endocr. **13**, 7 (1955).
Goslar, H. G.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 201 (1958).
Lembeck, F.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 50 (1953).
Rowntree, L. G., J. H. Clark and A. M. Hanson: Arch. int. Med. **56**, 1 (1935).
Shewell, J.: Brit. J. Pharmacol. **12**, 133 (1957).
Schaffer, N. K., W. M. Ziegler and L. G. Rowntree: Endocr. **23**, 593 (1938).
Schroeder, E. F., and G. E. Woodward: J. biol. Chem. **129**, 283 (1939).
Steinberg, A.: Endocr. **23**, 581 (1938).
Tesseraux, H.: Physiologie u. Pathologie des Thymus. Leipzig 1953.
Uhlenbrook, K.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **236**, 192 (1935).
Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik. 3. Aufl. Jena 1957.

Dr. med. Friedrich Hohensee, Jena/Thür., Johann-Friedrich-Str. 7

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 448—454 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster/Westf.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser)

Über die glykogenbildende Wirkung von Glykolen

Von
Klaus Opitz

(Eingegangen am 1. August 1958)

Während die glykogenbildende und Kohlenhydrat ersetzende bzw. einsparende Wirkung von 1,2-Propandiol (1,2-Propylenglykol) seit längerer Zeit bekannt ist und mehrfach untersucht wurde (Hunt, Salter u. Mitarb., Hanzlik u. Mitarb., Newman u. Mitarb., Winkle, Loeser u. Opitz), ist die Frage, ob und in welchem Ausmaß andere aliphatische Glykole in den Kohlenhydratstoffwechsel eingehen, noch nicht ausreichend beantwortet. Diäthylenglykol und 1,3-Propandiol sollen bei der Ratte nicht glykogenbildend wirken (Hanzlik u. Mitarb., Winkle). Schlüssel untersuchte die Verwertung von Polyalkoholen in der Ernährung. Bei Ratten bewirkte der Zusatz von 1,2-Butandiol bzw. 1,3-Butandiol zum Futter vermehrte Nahrungsaufnahme und stärkere Gewichtszunahme; der Calorienverbrauch pro Gramm Gewichtszunahme war nach Aufnahme von glykolhaltigem Futter geringer. Diese „Sparwirkung" soll mit den narkotischen Eigenschaften der Alkohole zusammenhängen. Die glykogenbildende Wirkung der Butandiole wurde nicht untersucht.

Daß nicht nur warmblütige Organismen Glykole verwerten können, haben Versuche an Froschlarven ergeben. 1,3-Butandiol förderte ebenso wie Glycerin Gewichtszunahme und Metamorphose von Kaulquappen (Grosskinsky u. Stürmer), und der Zusatz von 1,2-Propandiol bzw. 1,3-Butandiol zum Aufzuchtsmedium bewirkte vermehrten Glykogenansatz (Loeser u. Opitz).

Bei eigenen Versuchen über die Bildung von Glucose und Glykogen aus mehrwertigen Alkoholen *in vitro* ergab sich, daß in Rattenleberschnitten aus 1,2-Propandiol und 1,2,4-Butantriol wie aus 1,2,3,-Propantriol (Glycerin) Glucose entstehen kann, nicht aber aus 1,3-Propandiol oder 1,3-Butandiol. Es wurde daher die Vermutung ausgesprochen, daß nur solche zwei- oder dreiwertigen Alkohole in der Warmblüterleber zum Aufbau von Kohlenhydraten verwertet werden können, deren Kohlen-

stoffkette drei oder mehr C-Atome umfaßt und die wenigsten zwei benachbarte Hydroxylgruppen aufweisen, von denen eine endständig ist (Opitz). Ob diese Annahme zutrifft, sollten Versuche ergeben, in denen der Einfluß mehrerer Glykole auf den Glykogengehalt der Leber hungernder Ratten untersucht wurde. Zur Anwendung kamen: Äthandiol[1], Diäthylenglykol[2], 1,2-Propandiol[3], 1,3-Propandiol[4], 1,2-Butandiol[2], 1,3-Butandiol[2], 1,4-Butandiol[5] und 2,3-Butandiol[6]. Außerdem wurde die glykogenbildende Wirkung von Glykolaldehyd[2] (Fp. 95—98°), einem Oxydations- und Stoffwechselprodukt von Äthandiol, und seine Entstehung aus Äthandiol in der Leber untersucht.

Drei der genannten Verbindungen haben biologische Bedeutung, nämlich 1,2-Propandiol, 2,3-Butandiol und Glykolaldehyd.

1,2-Propandiol ist als Phosphorsäureester (1,2-Propandiol-1-phosphat = PDP) physiologischer Bestandteil vieler tierischer Organe und konnte auch aus Tumorgewebe isoliert werden (Rudney). PDP wird durch die α-Glycerophosphatdehydrogenase oxydiert (Miller u. Mitarb.). Seine Stellung im Zwischenstoffwechsel ist von Rudney und von Huggins u. Miller untersucht worden.

2,3-Butandiol entsteht im Organismus aus Pyruvat und Acetoin und kann umgekehrt wieder in Acetoin übergehen. Diese Reaktion wird von der 2,3-Butandioldehydrase vermittelt, die von Aubert u. Gavard erstmalig isoliert wurde (vgl. Strecker u. Harary; Järnefelt). In vitro kann 2,3-Butandiol die Atmung von Gewebshomogenaten steigern (Dawson u. Hullin).

Glykolaldehyd schließlich ist ein Stoffwechselprodukt, das mehr beachtet wird, seit bekannt ist, daß ein aktiver Enzymkomplex dieser Verbindung bei der Umwandlung von Pentosen in Hexose durch die Transketolase-Reaktion beteiligt ist. In Gegenwart von Transketolase bilden verschiedene Ketozucker und Oxypyruvat einen „aktivierten Glykolaldehyd", der mit einem Acceptoraldehyd sich zu neuen Ketozuckern kondensiert. Freier Glykolaldehyd tritt bei dieser Reaktion, die besonders beim Glucoseabbau über den Pentosephosphatcyclus in der Leber eine Rolle spielt, allerdings nicht auf (Lang). Außerdem wird Glykolaldehyd als Zwischenprodukt bei der Biosynthese der Ribose, bei der Umwandlung von Äthanolamin in Glykokoll sowie bei der Acetatbildung aus Äthanolamin oder Pentose angenommen (Literatur bei Friedmann u. Mitarb.). Breusch fand 1943 eine bis dahin nicht bekannte spezifische Glykolaldehyddehydrogenase in der Katzenleber. Glykolaldehyd-2-C^{14} wird im Rattenkörper schnell zu Glykokoll und CO_2 umgewandelt; ein Teil aber geht in Ameisen- und Oxalsäure und auch in Glykogen über. Diese Glykogenbildung aus Glykolaldehyd soll indirekt über Glykokoll, Serin und Triose verlaufen (Friedmann u. Mitarb.). Bei der besonderen Bedeutung von Glykolaldehyd im Zwischenstoffwechsel ist bemerkenswert, daß er — abgesehen von Versuchen mit Mikroorganismen (Goepfert u. Nord; Kaushal u. Walker) — bisher noch nicht aus biologischem Material isoliert werden konnte. Diese Tatsache ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß Glykolaldehyd ebenso schnell „utilisiert" wird, wie er (aus Äthandiol) entsteht, und somit allen Abfangmanövern entgeht (Sumner u. Myrbäck).

---

[1] E. Merck, Darmstadt. [2] Chemische Werke Hüls. [3] Farbwerke Hoechst.
[4] Heyl & Co., Berlin und Hildesheim.
[5] Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen am Rhein.
[6] Amcel Co., Inc. New York.

Methodisches

1. Untersuchung der glykogenbildenden Wirkung. Männliche Ratten von 150 bis 250 g Körpergewicht wurden mehrere Wochen lang bei Standard-Trockenfutter[1] und Leitungswasser — beides ad libitum — unter gleichmäßigen Licht- und Temperaturbedingungen in Einzelkäfigen gehalten. Nach 48stündigem Entzug des Futters wurde den Tieren morgens die zu untersuchende Substanz als wäßrige Lösung (10 bzw. 20 cm^3/kg) oral zugeführt. (Nur Glykolaldehyd wurde auch intraperitoneal injiziert.) Die Kontrolltiere erhielten zur gleichen Zeit 10 bzw. 20 cm^3/kg physiologische Kochsalzlösung oral bzw. — im Fall von Versuchen mit Glykolaldehyd — auch intraperitoneal. 3 Std später wurden die Tiere getötet und die unverzüglich entnommene Leber in ein vorher gewogenes Gefäß mit heißer Kalilauge (30%) eingebracht. Dieser Arbeitsgang dauerte nicht länger als 30 sec. Nachdem die Gefäße ein zweites Mal gewogen worden waren, wurde das Leberglykogen nach Staudinger isoliert und in der von Sarreither u. Röckel angegebenen Modifikation polarimetrisch bestimmt. Der Glykogengehalt wurde stets in Milligramm pro 100 g Leber (Frischgewicht) angegeben.

2. Untersuchung der Glykolaldehydbildung aus Äthandiol. Männliche Ratten (250—330 g) erhielten nach 48stündiger Futterkarenz 4,5 cm^3/kg Äthandiol in Form einer wäßrigen Lösung (45 Vol-%) intraperitoneal. 2 Std später wurden die Tiere im Kühlraum getötet und die Leber rasch in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Das gefrorene Organ wurde pulverisiert und mit einigen Kubikzentimetern einer gekühlten Lösung von Trichloressigsäure (20%) verrieben. — Um Glykolaldehyd auch im Blut nachzuweisen, wurde von Ratten, die wie oben vorbehandelt waren, 2 cm^3 Blut durch Herzpunktion gewonnen und nach Folin Wu enteiweißt. — Die Glykolaldehydbestimmung in den eiweißfreien Filtraten wurde nach Dische u. Borenfreund durchgeführt. Die Eichkurve verlief im Konzentrationsbereich von 0,1—2,0 mg-% linear, so daß noch 1 γ Glykolaldehyd nachgewiesen werden konnte.

Ergebnisse

Die Untersuchung von Substanzen, die den Glykogengehalt der Leber beeinflussen, ist infolge der großen physiologischen Schwankungen schwierig. Es wurden daher Versuchsbedingungen gewählt, die einen wenigstens annähernd gleichmäßigen Glykogengehalt gewährleisten. Daß dies aber nur in sehr bescheidenem Umfang möglich ist, zeigen die Werte der Kontrolltiere in Tab. 1 u. 2. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in äquimolaren Dosen gegeben — gewöhnlich 50 mMol/kg —, um ihre Wirkungen vergleichen zu können. 1,4-Butandiol mußte wegen seiner relativ hohen Toxicität allerdings in kleinerer Dosis zugeführt werden. Sämtliche Glykole wurden in den angegebenen Mengen im allgemeinen ohne toxische Erscheinungen vertragen. Nur gelegentlich trat eine geringfügige narkotische Wirkung ein.

Die in Tab. 1 zusammengefaßten Ergebnisse lassen trotz der großen Streuung der Einzelwerte erkennen, daß von den untersuchten Glykolen

[1] Hartgebäck aus 44,2% Maismehl, 33,2% Haferflocken, 8,2% Trockenhefe, 11,1% Trockenmagermilch, 2,2% Lebertran und 1,1% Salzgemisch nach McCollum u. Simmonds (34,6 g Kochsalz, 69,4 g prim. Natriumphosphat, 190,8 g sec. Kaliumphosphat, 108,0 g prim. Calciumphosphat, 23,6 g Ferricitrat, 260,0 g Calciumlactat und 52,2 g Magnesiumsulfat).

nur 1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol und Äthandiol glykogenbildend wirken. Diäthylenglykol, 1,3-Propandiol, und 2,3-Butandiol waren ohne deutlichen Einfluß auf den Gehalt der Leber an Glykogen, 1,3-Butandiol und 1,4-Butandiol setzten ihn herab.

In ihrer chemischen Struktur sind die drei glykogenbildenden Glykole 1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol und Äthandiol durch zwei benachbarte Hydroxylgruppen gekennzeichnet, von denen eine endständig ist. Insoweit findet die oben erwähnte Hypothese ihre Bestätigung. Der Befund,

Tabelle 1. *Glykogengehalt der Leber von hungernden Ratten 3 Std nach oraler Zufuhr verschiedener Glykole in wäßriger Lösung bzw. physiologischer Kochsalzlösung*

Substanz	Dosis pro kg K. G.		Anzahl der Tiere	Leberglykogen (Mittelwerte in mg-%, ± mittlere Abweichung)
	mMol	cm^3 wäßrige Lösung		
physiol. Kochsalzlösung		20	11	135 ± 82
1,2-Propandiol	100	20	12	**739** ± 304
1,2-Butandiol	100	20	13	**358** ± 212
physiol. Kochsalzlösung		10	26	138 ± 92
Äthandiol	50	10	12	**255** ± 153
Diäthylenglykol	50	10	7	183 ± 122
1,2-Propandiol	50	10	14	**779** ± 368
1,3-Propandiol	50	10	11	116 ± 92
1,2-Butandiol	50	10	17	**283** ± 125
1,3-Butandiol	50	10	12	71 ± 39
2,3-Butandiol	50	10	16	105 ± 56
1,4-Butandiol	10	10	11	77 ± 51

Die fettgedruckten Mittelwerte sind gegenüber den zugehörigen Kontrollwerten signifikant erhöht ($P < 0{,}05$, t-Verteilung nach STUDENT bzw. FISHER).

daß auch Äthandiol zu den glykogenbildenden zweiwertigen Alkoholen gehört, ist zunächst überraschend, denn diese Verbindung wird nicht zu den Zuckerbildnern gerechnet (vgl. FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ). In eigenen Versuchen an Rattenleberschnitten ließ sich die Entstehung von Zucker aus Äthandiol tatsächlich nicht nachweisen. Die glykogenbildende Wirkung von Äthandiol kann aber erklärt werden, wenn berücksichtigt wird, daß die Umwandlung von Glykolen in Kohlenhydrate nur auf dem Umweg über verschiedene Zwischenstoffe möglich ist. Äthandiol wird im Organismus bekanntlich bis zur Oxalsäure oxydiert, wobei die Stufen Glykolaldehyd, Glykolsäure, Glyoxal und Glyoxylsäure durchlaufen werden können. Im Harn von Kaninchen, die Äthandiol per os erhalten hatten, wurden z. B. große Mengen von Glykolsäure und Oxalsäure gefunden (MAYER). Da das erste, bisher allerdings noch nicht isolierte Umwandlungsprodukt von Äthandiol, Glykolaldehyd, nach Angaben der Literatur zuckerbildend ist, wenn auch die alte Vorstellung, daß sich

drei Moleküle Glykolaldehyd zu einem Hexosemolekül vereinigen können, offenbar nicht zutrifft, fragt sich, ob die nach Verabfolgung von Äthandiol festgestellte Zunahme des Glykogengehaltes der Leber auf einer Glykogenbildung aus Glykolaldehyd beruht.

Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, 1. ob Glykolaldehyd selbst den Glykogengehalt der Leber tatsächlich vermehrt, und 2. ob die Entstehung von Glykolaldehyd aus Äthandiol im Organismus nachgewiesen werden kann.

Tabelle 2. *Glykogengehalt der Leber (in mg-%) von hungernden Ratten 3 Std nach intraperitonealer Zufuhr von 5 mMol Glykolaldehyd als wäßrige Lösung.* Volumen 10 cm³ (Versuchstiere) bzw. 10 cm³ physiol. Kochsalzlösung (Kontrolltiere) je Kilogramm Körpergewicht

Versuchstiere	Kontrolltiere
168	147
444	133
304	52
101	43
370	128
250	53
109	189
210	50
276	184
339	69
868	193
654	28
175	146
302	183
118	24
206	194
183	—
299 mg-%	114 mg-%

($P < 0{,}01$).

Nach oraler Zufuhr von 25 mMol/kg Glykolaldehyd (2,5 molare wäßrige Lösung) war der Glykogengehalt der Leber bei vier von 6 Versuchstieren erheblich vermehrt: 547, 243, 618 und 792 mg-%. Vergiftungserscheinungen fehlten bei diesen Tieren. Bei den übrigen trat tiefe Narkose ein; Leberglykogengehalt 134 bzw. 29 mg-%. Dieses unterschiedliche Verhalten der Versuchstiere könnte mit ungleichmäßigen Resorptionsverhältnissen zusammenhängen. Deshalb wurde der Aldehyd in einer zweiten Versuchsreihe intraperitoneal injiziert (vgl. Tab. 2). Die Dosis von 5 mMol/kg Glykolaldehyd wurde unter diesen Umständen ausnahmslos gut vertragen und bewirkte bei der Mehrzahl der Versuchstiere eine deutliche Zunahme der Leberglykogenmenge. Werden die Mittelwerte verglichen, so zeigt sich, daß 5 mMol/kg Glykolaldehyd stärker glykogenbildend wirken als 50 mMol/kg Äthandiol.

Die zweite Frage, nämlich ob die Entstehung von Glykolaldehyd aus Äthandiol in vivo nachweisbar ist, bereitete große Schwierigkeiten. Sie sind darauf zurückzuführen, daß der im Organismus aus Äthaniol gebildete Glykolaldehyd offenbar sehr rasch weiter oxydiert wird, so daß jeweils nur Spuren davon vorhanden sind. Zur Bestimmung geringer Mengen eignet sich die sehr empfindliche Methode von Dische u. Borenfreund. Mit dieser Methode konnten im Lebergewebe von drei Versuchstieren, die 4,5 cm³/kg Äthandiol (45 Vol-% wäßrige Lösung) intraperitoneal

erhalten hatten, 30, 57 und 93 γ-% Glykolaldehyd ermittelt werden. In der Leber der Kontrolltiere fanden sich dagegen nicht einmal Spuren von Glykolaldehyd. Versuche, nach Zufuhr von Äthandiol auch im Blut Glykolaldehyd nachzuweisen, waren — wahrscheinlich wegen der zu geringen Mengen an Untersuchungsmaterial — erfolglos.

Auf Grund der vorstehenden Ergebnisse darf angenommen werden, daß die Vermehrung der Glykogenmenge in der Leber hungernder Ratten nach oraler Zufuhr von Äthandiol tatsächlich auf der Umwandlung von Äthandiol in Glykolaldehyd beruht. Dieser Befund bildet gewissermaßen ein Gegenstück zu den Beobachtungen von Kaushal u. Walker, die zeigen konnten, daß Mikroorganismen (Acetobacter acetigenum) aus Äthandiol Cellulose bilden können, wobei Glykolaldehyd als Zwischenprodukt sichergestellt werden konnte. In beiden Fällen produzieren lebende Zellen ein Polysaccharid — Glykogen bzw. Cellulose — aus Äthandiol.

Die Frage, welche Zwischenprodukte bei anderen Glykolen wie 1,2-Propandiol und 1,2-Butandiol die glykogenbildende Wirkung vermitteln, kann hier nicht beantwortet werden.

Zusammenfassung

1. 1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol und Äthandiol bewirken eine Glykogenvermehrung in der Leber hungernder Ratten.

2. Die Glykogenvermehrung nach Zufuhr von Äthandiol wird auf die zuckerbildende Wirkung von Glykolaldehyd, einem im Organismus entstehenden Oxydationsprodukt von Äthandiol, zurückgeführt.

3. Diäthylenglykol, 1,3-Propandiol, 1,3-Butandiol, 2,3-Butandiol und 1,4-Butandiol haben unter den gewählten Bedingungen keine glykogenbildende Wirkung.

Den genannten Firmen wird für die freundliche Überlassung der für diese Untersuchung benötigten Substanzen gedankt.

Literatur

Aubert, J.-P., et R. Gavard: C. R. Acad. Sci. (Paris) **233**, 1320 (1951).
Breusch, F. L.: Enzymologia **11**, 87 (1943).
Dawson, J., and R. P. Hullin: Biochem. J. **57**, 180 (1954).
Dische, Z., and E. Borenfreund: J. biol. Chem. **180**, 1297 (1949).
Flaschenträger, B., und E. Lehnartz: Physiologische Chemie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1954. Bd. IIa, S. 764.
Friedmann, B., H. W. Levin and S. Weinhouse: J. biol. Chem. **221**, 665 (1956).
Goepfert, G. J., and F. F. Nord: Arch. Biochem. **1**, 289 (1943).
Grosskinsky, L., u. E. Stürmer: Z. ges. exp. Med. **120**, 134 (1953).
Hanzlik, P. J., A. J. Lehman, W. van Winkle, jr. and N. K. Kennedy: J. Pharmacol. exp. Ther. **67**, 114 (1939).
Huggins, C. G., and O. N. Miller: J. biol. Chem. **221**, 719 (1956).
Hunt, R.: Industr. a. Engin. Chem. **24**, 361, 836 (1932).

Järnefelt, J.: Ann. Acad. Sci. fenn. A **57**, 1 (1955); zit. n. Ber. ges. Physiol. **183**, 245 (1956).
Kaushal, R., and T. K. Walker: Nature (Lond.) **1947**, 572; Biochem. J. **48**, 618 (1951).
Lang, K.: Biochemie der Ernährung. Darmstadt 1957.
Loeser, A., u. K. Opitz: Z. ges. exp. Med. **129**, 526 (1958).
Mayer, P.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **38**, 135 (1903).
Miller, O. N., C. G. Huggins and K. Arai: J. biol. Chem. **202**, 263 (1953).
Newman, H. W., W. van Winkle, jr., N. K. Kennedy and M. C. Morton: J. Pharmacol. exp. Ther. **68**, 194 (1940).
Opitz, K.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 355 (1958).
Rudney, H.: J. biol. Chem. **210**, 353, 361 (1954).
Salter, W. T., P. D. Robb and F. H. Scharles: J. Nutr. **9**, 11 (1935); zit. n. E. P. Laug: J. industr. Hyg. **21**, 173 (1939).
Sarreither, W., u. I. Röckel: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **289**, 284 (1952).
Schlüssel, H.: Klin. Wschr. **1953**, 768. — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 67 (1954).
Staudinger, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **275**, 122 (1942).
Strecker, H. J., and I. Harary: J. biol. Chem. **211**, 263 (1954).
Sumner, J. B., and K. Myrbäck: The Enzymes. Bd. II, S. 748. New York 1951.
Winkle, jr., W. van: J. Pharmacol. exp. Ther. **72**, 227 (1941).

Dr. Klaus Opitz, Pharmakologisches Institut der Universität, Münster/Westf., Westring 12

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 455—473 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die freien Nucleotide des Gehirns im generalisierten Krampfanfall

Von

H. Coper, H. Herken und W. Koransky

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juni 1958)

Die Spezifität pharmakologischer Wirkungen am Zentralnervensystem läßt darauf schließen, daß die ausgelösten Funktionsänderungen, deren Intensität und Dauer im allgemeinen von der Konzentration des auslösenden Agens am Einwirkungsort abhängen, auf definierten biochemischen Reaktionen in den Nervenzellen beruhen. Meist handelt es sich um kurzfristige Wirkungen, die eine Erfassung der chemischen Veränderungen erschweren. Doch haben sich viele Untersucher durch Bestimmung der Stoffwechselprodukte während verschiedener Funktionszustände des Zentralnervensystems bemüht, einen besseren Einblick in den feineren Wirkungsmechanismus der Pharmaka zu gewinnen. So fanden z. B. Richter u. Dawson sowie Wladimirow bei der generalisierten Erregung des Gehirns eine Vermehrung des Ammoniaks und andere Untersucher (siehe Weil-Malherbe; Gerard; Stone) eine Anhäufung von Milchsäure, von CO_2, anorganischem Phosphat und eine Abnahme von Glucose und Glykogen. Das bei der Erregungsübertragung wichtige Acetylcholin zeigt in der Narkose eine Zunahme, während bei der generalisierten Erregung entgegen den Befunden von Richter u. Crossland nach neueren Untersuchungen offenbar keine Konzentrationsänderung auftritt (Elliot, Swank, Henderson; Torda 1953a; Herken u. Neubert).

Es war naheliegend, die im Energiestoffwechsel so bedeutungsvollen Nucleotide in diese Untersuchung einzubeziehen. Auch hier sind Änderungen der Konzentration während des generalisierten Krampfanfalles und während der Narkose beschrieben worden (Klein u. Olson; Bain u. Pollock; Bain, Pollock u. Stein; Le Page; Palladin; Coper; Grenell; Quastel; Hunter u. Lowry; Abood, Gerard und Tschirgi; Gerlach, Döring u. Fleckenstein). Einige dieser Autoren wollen erkannt haben, daß die Funktionsänderung durch einen Eingriff des Pharmakons in die energieübertragenden Reaktionen bewirkt wird.

Bei den meisten dieser zuletzt genannten Untersuchungen wurden nur Kreatinphosphat und die Adeninnucleotide erfaßt. Die Analyse dieser Verbindungen erfolgte bei den älteren Untersuchungen im allgemeinen durch Fällung der Nucleotide mit anschließender Bestimmung des Gesamtphosphates und des leicht hydrolysierbaren Phosphates. Erst nach Einführung chromatographischer Methoden, insbesondere der Ionenaustausch-Chromatographie, gelang eine weitgehende Differenzierung der zahlreichen Nucleotide verschiedener Gewebe. Dabei wurden auch Verbindungen gefunden, die andere Basen als Adenin enthalten. (Cohn; Hurlbert, Schmitz, Brumm u. Potter; Schmitz, Hurlbert u. Potter). In einer früheren Arbeit ist die Trennung, Isolierung und Identifizierung der Nucleotide des Rattengehirnes mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie, der Papierchromatographie sowie spektralphotometrischer und anderer chemischer Verfahren beschrieben worden (Koransky, 1958). Unter Verwendung dieser Methoden wurde versucht, weitere Einblicke in die Zusammenhänge zwischen der Konzentration der Nucleotide und dem Funktionszustand des Gehirns zu gewinnen.

Methode

Bei allen Versuchen wurden weiße Ratten beiderlei Geschlechts im Gewicht von 120—160 g verwendet. Angaben über Dosis und Applikationsweise der untersuchten Substanzen sowie über den Zeitpunkt der Tötung finden sich bei der Wiedergabe der einzelnen Versuchsergebnisse.

1. Darstellung der Gehirnextrakte. *a) Papierchromatographie.* Zur Gewinnung von Extrakten für die Papierchromatographie wurden die Tiere durch Scherenschlag dekapitiert, das Gehirn nach Eröffnung der Schädelkapsel entnommen und innerhalb von 15 sec in 2,5 cm^3 5%iger eiskalter Trichloressigsäure im vorgekühlten Mörser zerrieben. Die so gewonnenen Homogenate wurden quantitativ in eisgekühlte Zentrifugengläser überspült und 1 min bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. Vom klaren überstehenden Extrakt wurden 0,4 cm^3 direkt auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen. Der Rückstand wurde im Zentrifugenglas bei 90° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend gewogen. Die gemessenen Nucleotidkonzentrationen wurden jeweils auf dieses Trockengewicht bezogen.

Für die papierchromatographische Trennung der Nucleotide wurde das von Eggleston und Hems angegebene Lösungsmittelgemisch Propanol/Ammoniak/Wasser im Verhältnis 60/30/10 benutzt. Nach zweimaliger absteigender Chromatographie von je 16 Std Dauer sind 4 Fraktionen gut voneinander getrennt. Die Verwendung anderer Lösungsmittelgemische (Carter; Löfgren) oder der zweidimensionalen Chromatographie sowie des von Fleckenstein u. Gerlach modifizierten Verfahrens einer nacheinander folgenden Chromatographie in zwei entgegengesetzten Richtungen an einem gefalteten Papier brachte für die vergleichenden Untersuchungen keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der Anordnung von Eggleston u. Hems.

b) Ionenaustauschchromatographie. Die Darstellung der Gehirnextrakte für die Ionenaustauschchromatographie erfolgte durch Guillotinieren der Tiere mit einem T-förmigen Messer. Die so freigelegten Hemisphären wurden nach Entnahme aus dem Schädel in flüssiger Luft eingefroren, zerkleinert und mit 1 n Perchlorsäure extrahiert. Nach Neutralisieren des Extraktes mit 5 n KOH und Abtrennung des

ausgefallenen $KClO_4$ wurde die Lösung direkt zur Chromatographie auf den Austauscher gebracht. Die chromatographische Trennung geschah auf DOWEX 1 nach dem von Hurlbert, Schmitz, Brumm u. Potter entwickelten Verfahren der Gradientenelution mit Ameisensäure-Ammoniumformiat. Die Angaben über Abmessung von Säule und Mischgefäß sowie über die Konzentration und die Menge der benutzten Elutionsmittel finden sich in der Legende der Abb. 3. Die durch Messung der UV-Absorption ermittelten Werte für die getrennten Substanzen wurden auf den im säureunlöslichen Rückstand bestimmten N-Gehalt bezogen. Dieser steht in fester Relation zum Feucht- und Trockengewicht. (1 Gehirn $\approx$ 1,5 g Feuchtgewicht $\approx$ 300 mg Trockengewicht $\approx$ 23 mg Stickstoff bei Tieren von 120—160 g Gewicht).

2. Identifizierung und Bestimmung der Nucleotide. Die Konzentration der durch Papier- und Austausch-Chromatographie gewonnenen Nucleotide wurde durch Messung der UV-Absorption der Eluate bei 260 mμ im Beckman-Spektralphotometer DU bestimmt. Die durch Papierchromatographie getrennten Fraktionen wurden dazu mit n/100 HCl aus dem Papier eluiert. Ein den Fraktionen entsprechendes leeres Papierareal diente nach gleicher Behandlung bei den einzelnen Bestimmungen als Leerwert. Die Säuleneluate wurden nach Bestimmung der UV-Absorption für die weiteren analytischen Untersuchungen durch Gefriertrocknung von der Ameisensäure und dem Ammoniumformiat befreit. Die Ribose wurde mit Orcin nach Mejbaum modifiziert durch Barnum mit AMP als Bezugssubstanz und bei einigen Uridinverbindungen durch Perjodatoxydation nach Dixon u. Lipkin bestimmt. Der Phosphatgehalt wurde nach Berenblum u. Chain gemessen.

Die Hydrolyse der einzelnen Fraktionen zur Gewinnung der freien Basen erfolgte durch Behandlung mit 12 n $HClO_4$ bei 100° während einer Stunde (Marshak u. Vogel). Nach Neutralisation des Hydrolysates mit KOH und Abzentrifugieren des ausgefallenen $KClO_4$ wurden die Basen durch Bindung an den Anionenaustauscher DOWEX 1 von stark gefärbten Beimengungen getrennt. Sie wurden anschließend mit wenig n/10 HCl eluiert und nach Abdampfen der Säure auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen. Die Identifizierung der Basen geschah durch Aufnahme der Spektren in saurer und alkalischer Lösung.

Nähere Angaben über die methodischen Einzelheiten finden sich in der Arbeit von Koransky (1958).

Ergebnisse

Bei der eindimensionalen Papierchromatographie der Gehirnextrakte lassen sich 4 Fraktionen voneinander abgrenzen (Abb. 1). Die Chromatographie der darin enthaltenen Basen ergab, daß der Adeninanteil in den ersten 3 Fraktionen etwa 90% beträgt. Wird der Ribose- und Phosphatgehalt auf diese Base bezogen, so ergeben sich die in Tab. 1 dargestellten Verhältnisse.

Tabelle 1

Analytische Daten papierchromatographisch getrennter Nucleotide des Rattengehirns

	Base		Ribose		Phosphat
1. Fraktion	1	:	1,06	:	2,60
2. Fraktion	1	:	1,06	:	2,33
3. Fraktion	1	:	1,01	:	3,07

Demnach besteht die zweite und dritte Fraktion weitgehend aus ADP und ATP. Obgleich die Phosphatwerte der 1. Fraktion wesentlich höher sind als dem AMP entsprechen würde, handelt es sich bei der UV-absorbierenden Substanz in der Hauptsache doch um AMP. Die zu hohen Phosphatwerte sind wahrscheinlich durch den Gehalt an Orthophosphat und an Zuckerphosphaten bedingt, die an gleicher Stelle lokalisiert sind. Eine mit reinem Adenosinmono-, di- und triphosphat durchgeführte Vergleichschromatographie zeigt, daß diese Substanzen gleiche R_f-Werte wie die Stoffe der ersten 3 Fraktionen des Papierchromatogramms des Gehirnextraktes besitzen. Wenn man bei diesen 3 Fraktionen die Verunreinigungen durch andere Basen vernachlässigt und die dadurch entstehenden geringen Fehler in Kauf nimmt, können die gefundenen Extinktionswerte als Maß für die Konzentration von AMP, ADP und ATP gelten. (Abb. 1).

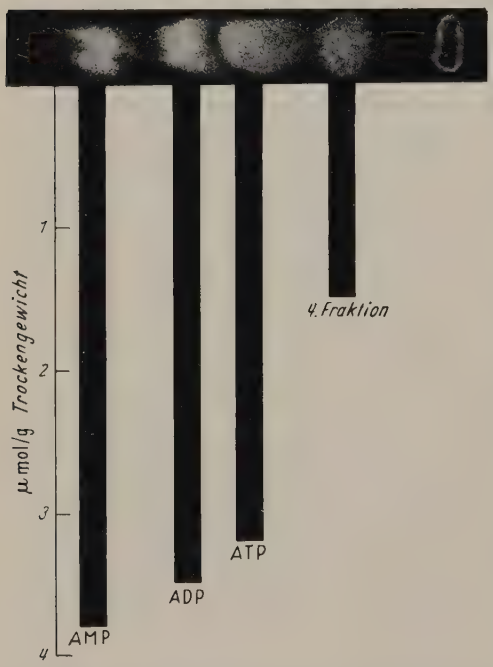


Abb. 1. Papierchromatographische Trennung und Bestimmung der säurelöslichen Nucleotide des Rattengehirns

Die einwandfreie Identifizierung der neben den Adeninverbindungen in der Fraktion 1—3 sowie aller in Fraktion 4 enthaltenen Nucleotide bietet gewisse Schwierigkeiten. Zunächst gelang eine weitere Differenzierung der Fraktion 4 durch Papierchromatographie unter Verwendung eines Isobuttersäure enthaltenden Gemisches nach Löfgren. Dabei konnten GDP und GTP abgetrennt werden. Die Ermittlung der Zusammensetzung der übrigen Verbindungen scheiterte an der geringen Konzentration dieser Stoffe. Es wurde daher versucht, sie durch papierchromatographischen Vergleich mit den bei der Ionenaustauschchromatographie gewonnenen Substanzen und einigen käuflich erworbenen Verbindungen zu identifizieren. In dem zur Chromatographie der Gehirnextrakte benutzten System laufen an der Stelle der 1. Fraktion außer AMP auch DPN und UMP, in der 2. Fraktion neben ADP noch UDP, in der 3. Fraktion ATP, GMP und UDP-Hexoseverbindungen und in der

4. Fraktion neben GDP und GTP noch UTP. Außerdem lokalisieren sich im Bereich der 4. Fraktion die folgenden Adenin-enthaltenden Verbindungen: Flavinadeninnucleotid, TPN, Co-Enzym A und Adenosintetraphosphat.

Berechnet man aus den Werten der Basenchromatographie den Gehalt der durch chromatographischen Vergleich in den einzelnen Fraktionen lokalisierten Verbindungen, so erhält man die in Abb. 2 auf

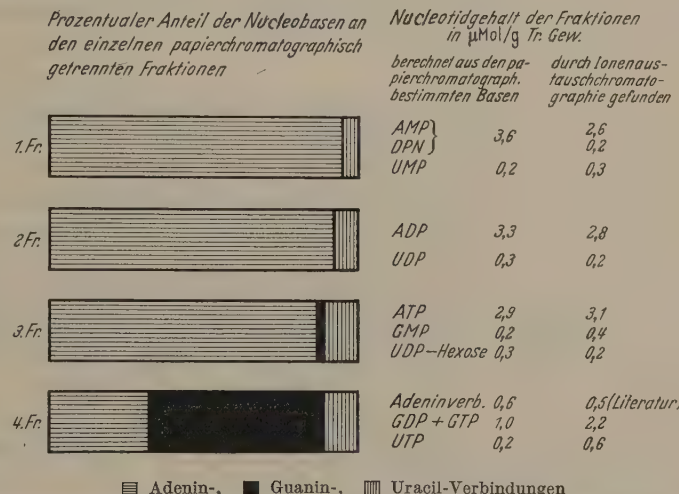


Abb. 2. Die säurelöslichen Nucleotide des Gehirns in den papierchromatographisch dargestellten Fraktionen

geführten Zahlen. Diese zeigen weitgehende Übereinstimmung mit den durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Ergebnissen. Die Nucleotide FAN, TPN und Co A, die sehr wahrscheinlich den Adeningehalt der 4. Fraktion bedingen, wurden bei der Ionenaustauschchromatographie nicht berücksichtigt. Die in Abb. 2 aufgeführten Werte für diese Substanzen wurden aus der Literatur entnommen. Danach sind im Gehirn $4{,}5 \cdot 10^{-7}$ Mol Co A (Lynen u. Decker), $0{,}5 \cdot 10^{-7}$ Mol TPN (Lowry, Roberts, Kapphahn) und $0{,}3 \cdot 10^{-7}$ Mol FAN (Birkofer) enthalten. Die Summe dieser Zahlen stimmt mit dem Adeningehalt der 4. Fraktion gut überein. Für das Vorhandensein von Adenosintetraphosphat ergab sich bis jetzt kein Anhalt.

Veränderungen durch Krampfgifte

Die generalisierten Krampfanfälle wurden durch intravenöse Injektion von 50 mg/kg Cardiazol ausgelöst. Die Tiere wurden in der tonischen Phase des Krampfes etwa 10—15 sec nach Beginn der Convulsionen getötet. Aus der Tab. 2 ist zu erkennen, daß im Verlauf des Krampfes

ATP und ADP bei Zunahme von AMP abnehmen. In der 4. Fraktion findet sich nur eine minimale Änderung der Gesamtmenge. Die Analyse der Basen ergibt jedoch eine Verschiebung der einzelnen Anteile untereinander. Während beim Adenin eine geringe Zunahme zu erkennen ist, nehmen die Guaninverbindungen in mäßigem Umfang, die Uracilverbindungen beträchtlich ab. Da die Uracilverbindungen nur einen geringen Anteil an der Gesamtmenge ausmachen, ist diese Änderung nur bei der Auftrennung der Basen zu erkennen.

Weitere Versuche wurden mit Krampfgiften unternommen, deren Vergiftungsbilder sich von dem des Cardiazols erheblich unterscheiden.

Tabelle 2. *Die freien Nucleotide des Rattengehirns in µMol/g Trockengewicht unter Einwirkung verschiedener Krampfgifte*

	Dosis	Zahl der Tiere	AMP	ADP	ATP	4. Frakt.*	S
Kontrollen .		44	3,8 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,2 ± 0,6	1,5 ± 0,2	12,0
Cardiazol .	50 mg/kg i.v.	28	4,6 ± 0,6°	3,1 ± 0,5°	2,3 ± 0,7°	1,4 ± 0,3	11,4+
Mintacol . .	0,9 mg/kg i.v.	23	3,6 ± 0,6	3,0 ± 0,4°	2,3 ± 0,7°	1,4 ± 0,3	10,3°
Scillirosid .	0,4 mg/kg oral	28♀	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,7	2,6 ± 0,8°	1,1 ± 0,4°	10,2°
Bernsteinsäuremonocholinesterchlorid	30 mg/kg i.p.	18	5,2 ± 1,6°	2,6 ± 0,7°	2,2 ± 0,6°	1,1 ± 0,4°	11,1+

S = Summe der Nucleotide.

* = Bei der Berechnung wurde die spez. Extinktion des Adenosins zu Grunde gelegt.

° = $p < 0{,}0027$ (gegen den entsprechenden Kontrollwert).

+ = $p \gtrless 0{,}01$

Es wurden das Cholinesterasegift Mintacol (-p-Nitrophenyldiaethylphosphat) und Scillirosid, ein Glykosid aus der roten Meerzwiebel, ausgewählt. Die Injektion von Cardiazol führt zu einem typischen Krampf mit initialer tonischer Streckung, dem sich ein klonisches Stadium mit Konvulsionen rasch abnehmender Intensität anschließt. Mintacol löst in einer Dosis von 0,9 mg/kg i.v. nach kurzer Zeit neben anderen Erregungsphänomenen fibrillär-fasciculäre Zuckungen aus (Wirth). Etwa 15 bis 20 sec nach Einsetzen dieser Erscheinungen wurden die Tiere dekapitiert. Die Tötung der mit 0,4 mg/kg Scillirosid oral vergifteten weiblichen Tiere erfolgte etwa 16—20 Std nach dem Einsetzen der charakteristischen von Rothlin u. Schalch beschriebenen Rollkrämpfe.

Tab. 2 zeigt die Ergebnisse der Versuche. Es ist zu erkennen, daß die ATP-Konzentration durch die Wirkung dieser Krampfgifte ebenso wie nach Einwirkung von Cardiazol signifikant vermindert wird. In gleichem Sinne, wenn auch in geringerem Ausmaß verändert sich der ADP-Gehalt,

während die Effekte der einzelnen Pharmaka beim AMP und der 4. Fraktion verschieden sind.

Bei den langanhaltenden Scillirosidkrämpfen nehmen sowohl der AMP-Gehalt als auch die Verbindungen der 4. Fraktion ab. Die Gabe von Mintacol beeinflußt diese beiden Nucleotidfraktionen offenbar nicht deutlich. Wie bereits beim Cardiazoleffekt demonstriert, kommt es auch durch die Wirkung dieser Krampfgifte zu einer Verschiebung im Basengehalt der 4. Fraktion.

Aus den Zahlen der Tab. 2 ist außerdem zu erkennen, daß die Gesamtmenge der Nucleotide mit Regelmäßigkeit nach Einwirkung der Krampfgifte abnimmt.

Für die Deutung der erhaltenen Ergebnisse ist die Beobachtung wichtig, daß eine durch Atemstillstand hervorgerufene zentrale Hypoxie die Nucleotidkonzentrationen im gleichen Sinne ändert wie eine durch Pharmaka ausgelöste zentrale Erregung. Zur Lähmung der Atemmuskulatur erhielten die Versuchstiere 30 mg/kg Bernsteinsäuremonocholinesterchlorid i.p. Die Tötung der Tiere erfolgte bei intakten Kreislaufverhältnissen 1 min nach Eintritt des völligen Atemstillstandes. Die Ergebnisse dieser Versuche sind zum Vergleich mit den Werten, die nach Einwirkung der Krampfgifte gefunden wurden, in Tab. 2 angeführt.

Die oben beschriebenen Befunde zeigen, daß die angewandte eindimensionale papierchromatographische Methode im wesentlichen nur eine Differenzierung der 3 Adeninnukleotide AMP, ADP und ATP gestattet. Frühere Untersuchungen haben jedoch erwiesen, daß im Gehirn ebenso wie in anderen Organen eine größere Zahl von Nucleotiden vorkommt, die statt Adenin andere Basen als charakteristischen Bestandteil enthalten. Einige dieser Nucleotide besitzen als Co-Fermente wichtige Funktionen im intermediären Stoffwechsel. Es war zu prüfen, ob bei der zentralen Erregung auch charakteristische Konzentrationsänderungen dieser Substanzen auftreten. Ihre analytische Erfassung gelingt am besten nach weitgehender Trennung mit Hilfe der Ionen-Austauschchromatographie. Aus diesem Grunde wurde bei den Versuchen mit Cardiazol neben der papierchromatographischen Analyse eine Auftrennung der Nucleotide durch Säulenchromatographie an einem Anionenaustauscher durchgeführt.

Aus Gehirnextrakten unbehandelter sowie behandelter Tiere ließen sich mit dieser Methode insgesamt etwa 20 einzelne Nucleotide abtrennen. Diese waren nach dem ersten Arbeitsgang in neun Banden bzw. Bandengruppen enthalten (Abb. 3). In der ersten Bande wurde im wesentlichen Adenosin gefunden. Die Nucleosidmonophosphate lokalisierten sich in Bande 2, 3 und 4, wobei Bande 2 dem AMP, Bande 3 dem GMP und Bande 4 dem UMP und IMP entsprachen. In der Bande 5 befindet sich ADP und in Bande 7 GDP und Hexoseverbindungen des UDP. Das

Triphosphat des Adenosins und das Diphosphat des Uridins wurden in der Bande 8 und die Triphosphate des Guanosins und Uridins in der Bande 9 eluiert. Außerdem sind in Bande 2 DPN, in Bande 3 TPN und in Bande 6 Flavin-Adeninnucleotid enthalten. Die zuletzt genannten Substanzen wurden bei der Untersuchung der Veränderungen im Cardiazolkrampf außer Betracht gelassen. Die Abb. 3 gibt gleichzeitig eine Übersicht über die ermittelten Konzentrationen der in den verschiedenen Bandengruppen enthaltenen Substanzen aus den Gehirnextrakten unbehandelter Tiere.

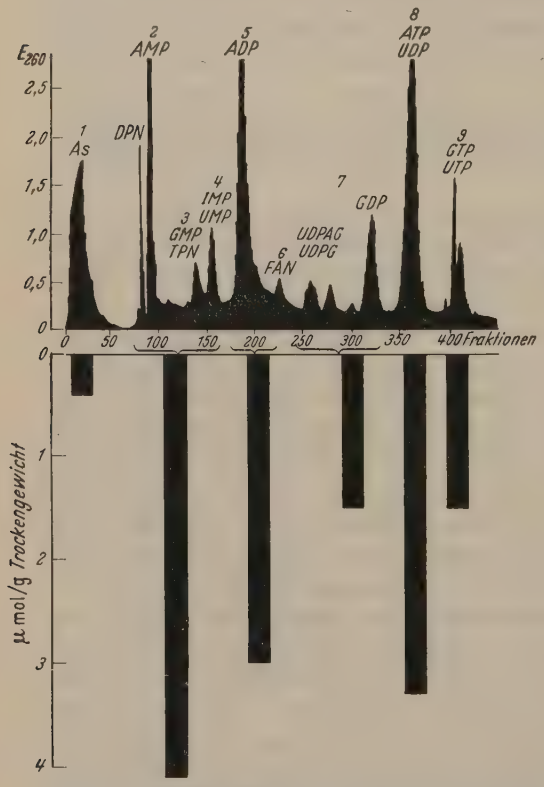


Abb. 3. Ionenaustauschchromatogramm und Bestimmung der säurelöslichen Nucleotide des Rattengehirns. Dowex 1 × 10 Formiat; Säule 1 · 20 cm; Mischgefäß 500 cm³; Elutionsflüssigkeit: 1—64 H_2O, 65–200 4 n HCOOH, 201—270 4 n HCOOH + 0,2 m $HCOONH_4$, 271—390 4 n HCOOH + 0,4 m $HCOONH_4$, 391 bis Ende 4 n HCOOH + 1 m $HCOONH_4$

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den bei der Papierchromatographie erhaltenen Werten für die drei Hauptfraktionen AMP, ADP und ATP, so findet sich eine gute Übereinstimmung.

Abb. 4 demonstriert die durch den Cardiazolkrampf bewirkten Veränderungen bei den durch die Gradienten-Elution erhaltenen Gruppen. Es kommt zu einer Abnahme der Triphosphate des Adenosins, Guanosins und Uridins sowie des ADP und GDP. Soweit bei den Versuchen eine Trennung der Banden 2, 3 und 4 durchgeführt wurde, zeigt sich deutlich, daß AMP und IMP zunehmen, während GMP, UMP sowie das Ribosid des Adenins keine eindeutigen Veränderungen erkennen lassen. In keinem Falle entspricht jedoch die Zunahme des AMP — auch nicht bei Zurechnung des IMP — der Abnahme der energiereichen Adenosinverbindungen. Daraus ergibt sich, daß die Gesamtmenge der Nucleotide unter der Wirkung des Cardiazols tatsächlich vermindert wird. Das Verschwinden eines Teils der Nucleotide aus der säurelöslichen Fraktion

wird in der Hauptsache durch die Abnahme der Adeninverbindungen, aber auch durch die Verminderung der andern Nucleotide verursacht. Dieser Befund ist statistisch gut gesichert.

Für die Deutung der beim generalisierten Krampfanfall gefundenen Veränderungen schien es wichtig, auch die Wirkung einiger antikonvulsiver Pharmaka auf die freien Nucleotide des Gehirns zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Isomere des Hexachlorcyklohexans benutzt, deren Verhalten in früheren Mitteilungen eingehend beschrieben wurde. (Herken 1950; Coper, Herken, Klempau 1951a; Coper, Herken, Klempau 1951b; Herken, Kewitz, Klempau 1952.) Ihre nachhaltige Wirkung ließ diese Substanzen für die Erfassung von Stoffwechselveränderungen besonders geeignet erscheinen.

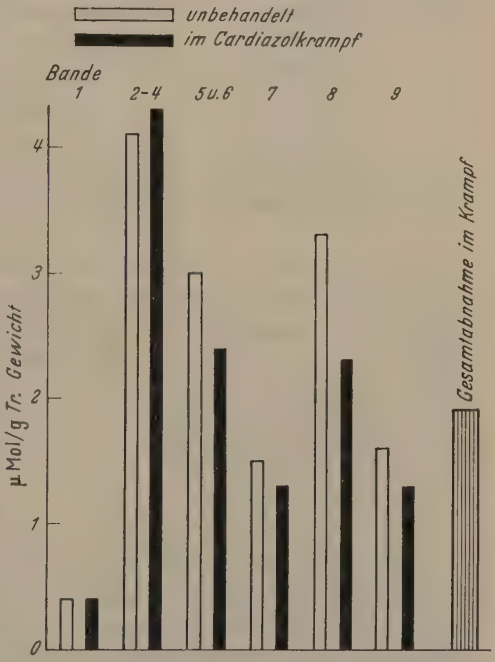


Abb. 4. Der Gehalt des Rattengehirns an säurelöslichen Nucleotiden unter der Wirkung von Cardiazol

Zur Testung dieser Verbindungen erhielten die Tiere eine einmalige Dosis von 200 mg/kg α-Hexachlorcyclohexan (HCH) bzw. 200 mg/kg β-HCH oder 80 mg/kg γ-HCH 1%ig in Rapsöl gelöst durch eine Schlundsonde. Die Tötung der Tiere erfolgte zum Zeitpunkt der maximalen krampfhemmenden Wirkung beim α- und γ-HCH am 4. Tag und beim β-HCH am 7. Tag nach der Applikation. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung des β-HCH am 7., 14., 21. und 28. Tage untersucht.

Die nach Einwirkung von α-, β- und γ-HCH durch Papier- und Ionenaustauschchromatographie erhobenen Befunde lassen nur geringe Variationen in den meisten Banden erkennen, die noch keine verbindliche Aussage über eine Veränderung der Konzentrationen einzelner Substanzen zulassen. (Tab. 3).

Die auffällige Vermehrung der im Papierchromatogramm in der 4. Fraktion lokalisierten Verbindungen, die besonders den Adeninanteil betrifft, kommt wohl deshalb im Austausch-Chromatogramm nicht zum Ausdruck, weil sich die zum Teil in geringer Konzentration vorhandenen Stoffe auf mehrere Banden verteilen.

Tabelle 3. *Der Gehalt des Rattengehirns an säurelöslichen Nucleotiden in µMol/g Trockengewicht unter der Einwirkung verschiedener Isomere der HCH*

a) Papierchromatographische Analyse:

Zahl d. Vers.-Tiere	Vorbehandlung	AMP	ADP	ATP	4. Frakt.*
44	Kontrollen	3,8 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,2 ± 0,6	1,5 ± 0,2
26	200 mg/kg α HCH	3,7 ± 0,6	3,4 ± 0,4	3,0 ± 0,3	1,5 ± 0,2
30	200 mg/kg β HCH	3,7 ± 0,8	3,6 ± 0,7	3,2 ± 0,7	2,3 ± 0,5°
20	80 mg/kg γ HCH	3,8 ± 0,5	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,7°	2,1 ± 0,4°

* Bei der Berechnung wurde die spez. Extinktion des Adenosins zugrunde gelegt.
° $p = < 0{,}0027$ (gegen den entsprechenden Kontrollwert).

b) Ionenaustauschchromatographische Trennung:

Zahl der Versuche (je 20 Tiere)	Vorbehandlung	Bezeichnung der eluierten Fraktionen					
		1	2—4	5 u. 6	7	8	9
7	Kontrollen	0,4	4,1	3,0	1,5	3,3	1,6
3	200 mg/kg α HCH	0,3	3,8	2,5	1,9	3,2	1,6
4	200 mg/kg β HCH	0,4	4,2	3,2	1,5	3,0	1,4

Während die bisher beschriebenen Experimente auf dem Höhepunkt der Hexachlorcyklohexanwirkung durchgeführt wurden, ist die Beobachtungszeit in einem weiteren Versuch auf 4 Wochen nach der HCH-Applikation ausgedehnt worden. Die Untersuchung erfolgte am 7., 14., 21. und 28. Tag nach der Verabreichung der üblichen Dosis von 200 mg/kg β-HCH. Aus der Abb. 5 ist zu entnehmen, daß sich in der AMP- und ATP-Fraktion keine Veränderungen während der ganzen Beobachtungszeit ergeben. Es ist auffallend, daß Abweichungen in der 4. Fraktion zu dem Zeitpunkt auftreten, an dem auch die antikonvulsiven Wirkungen besonders ausgeprägt sind, um dann wieder im Verlauf der nächsten sieben Tage zur Norm zurückzukehren. Die ADP-Fraktion, die bis zum 7. Tag keine Veränderung erkennen läßt, nimmt in der zweiten Woche der Beobachtungszeit geringfügig ab.

Ob die HCH-Applikation den Stoffwechsel der Nucleotide im Zentralnervensystem charakteristisch beeinflußt und diese Veränderungen für die antikonvulsiven Wirkungen verantwortlich sind, wird jedoch erst nach Durchführung weiterer Analysen mit quantitativer Erfassung aller Nucleotidverbindungen entschieden werden können.

Da die Krampfgifte eine Abnahme der energiereichen Nucleotide bewirken, die krampfhemmenden HCH jedoch keine entsprechenden Konzentrationsänderungen dieser Substanzen hervorrufen, war es von besonderem Interesse, das Verhalten der Nucleotide unter der gleichzeitigen Einwirkung von HCH und Cardiazol zu untersuchen. Dabei wurden krampfresistente Tiere mit solchen verglichen, bei denen die antikonvulsive Wirkung des HCH durch das Krampfgift durchbrochen wurde. Die Tiere wurden dazu mit 250 mg/kg α-HCH vorbehandelt und erhielten am Höhepunkt der Wirkung 50 mg/kg Cardiazol i.v., eine Dosis, die über der LD 50 liegt. Bei dieser Behandlung waren etwa 50% der Tiere krampfresistent. Wie aus den Zahlen der Tab. 4 ersichtlich ist, zeigten diese Tiere keine der Cardiazolwirkung entsprechende Veränderung der Nucleotide. Bei der Durchbrechung der Krampfresistenz ergaben sich dagegen gleichsinnige, wenn auch nicht so ausgeprägte Veränderungen wie bei der Cardiazolwirkung ohne Vorbehandlung mit HCH.

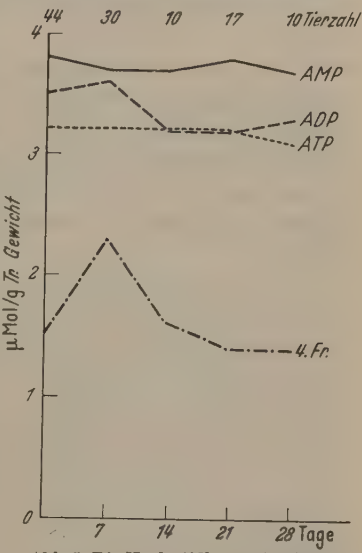


Abb. 5. Die Nucleotidkonzentration des Rattengehirns unter der Einwirkung von β-HCH im Verlauf von 28 Tagen

Tabelle 4. *Die säurelöslichen Nucleotide des Rattengehirns in µMol/g Trockengewicht bei gleichzeitiger Einwirkung von α-Hexachlorcyclohexan und Cardiazol*

Vorbehandlung	Test nach 4 Tagen	Zahl der Versuchstiere	AMP	ADP	ATP	4. Frakt.*
α HCH 250 mg/kg oral	Cardiazol 50 mg/kg i.v.	ohne Kr 16	4,1 ± 0,5	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,4	1,6 ± 0,3
		mit Kr 12	4,5 ± 0,6	3,3 ± 0,4	2,9 ± 0,3°	1,5 ± 0,2

* Bei der Berechnung wurde die spez. Extinktion des Adenosins zugrunde gelegt.
° $p = 0{,}005$.

Diskussion

Elektroschock, Cardiazol und Pikrotoxin erzeugen Krämpfe, deren äußere Erscheinungsbilder sich weitgehend gleichen. Bei Versuchen, diese Krämpfe mit chemischen Substanzen zu beeinflussen, hat sich gezeigt, daß die Wirksamkeit der verschiedenen Stoffe von der Art der Krampferzeugung abhängig ist. Der Elektroschock wird z. B. am stärksten durch Hydantoine unterdrückt, zur Hemmung von Cardiazolkrämpfen

ist Luminal besonders geeignet (Toman u. Goodman). Die Versuche von Herken 1950, Coper, Herken, Klempau 1951a); Coper, Herken, Klempau 1951b; Herken, Kewitz, Klempau 1952 über die krampfhemmende Eigenschaft der Hexachlorcyklohexane haben ergeben, daß mit Hilfe der einzelnen Isomeren feinere Unterscheidungen der scheinbar gleichartig wirkenden Krampfgifte möglich sind. Der Krampferzeugung scheinen daher verschiedene, möglicherweise spezifische Wirkungsmechanismen zu Grunde zu liegen. Es ist jedoch fraglich, ob die gefundenen Veränderungen im Gehalt des Gehirns an freien Nucleotiden eine befriedigende Erklärung für diese früher festgestellten Unterschiede liefern.

Bei den sehr wahrscheinlich unspezifischen Konzentrationsänderungen steht die Abnahme der energiereichen Nucleotide im Vordergrund. Diese könnte durch energieverbrauchende Reaktionen bedingt sein, die an der Auslösung oder Unterhaltung der zentralen Erregung ursächlich beteiligt sind. Sie könnte aber auch durch Stoffwechselprozesse verursacht sein, die lediglich als Folgeerscheinung eines generalisierten Krampfanfalles betrachtet werden können.

Gerard; Stone; Schmidt, Kety u. Pennes; Geiger u. Magnes sowie Wortis, Shaskan, Impastado und Alimansi haben beschrieben, daß die von Krampfgiften oder von elektrischen Impulsen hervorgerufene Erregung mit einer Erhöhung des Stoffwechsels der Neuronen einhergeht, die mit einer Zunahme des Sauerstoffbedarfs verknüpft ist. Die Untersuchungen ergaben einen auf etwa das Doppelte der Norm gesteigerten Sauerstoffverbrauch des Gehirns. Die Konzentration der energiereichen Nucleotide müßte auch bei gesteigertem Umsatz erhalten bleiben, da der vermehrte Abbau durch die bei der erhöhten Atmung vermehrte Synthese aufgewogen wird. Die gefundene Abnahme dieser Verbindungen bei gleichzeitiger Zunahme des O_2-Verbrauchs ergibt dagegen Verhältnisse, wie sie bei einer Entkopplung von Atmung und Phosphorylierung entstehen. Es fehlt jedoch hierzu die entsprechende Vermehrung der energieärmeren Nucleotide. Die gefundenen Konzentrationsänderungen können daher nicht allein auf einer solchen Entkopplung beruhen.

In Arbeiten von Opitz u. Schneider; Opitz; Davies u. Bronk wurden Befunde beschrieben, die auch eine andere Deutung der angeführten Phänomene zulassen. Diese Autoren, die sich vorwiegend mit der Sauerstoffversorgung des ZNS beschäftigen, haben auf die besonderen Verhältnisse der Sauerstoffversorgung hingewiesen, die eine für das Gehirn charakteristische Stoffwechselsituation bedingen. In bestimmten Gebieten dieses Organs scheint die Sauerstoffzufuhr so begrenzt zu sein, daß die Versorgung für die normale Funktion gerade ausreichend ist. Die Tätigkeit dieser Gehirnzellen kann nicht wesentlich gesteigert werden, ohne daß es zu einer ungenügenden Sauerstoffversorgung und damit zur Störung der Funktion kommt. So erklärt sich, warum bei erhöhtem cellulärem Sauerstoffverbrauch, wie es unter Krämpfen der Fall ist, auch bei normalem arteriellem Sauerstoffangebot

eine gewisse Verarmung der Zellen an Sauerstoff eintreten kann. Diese Situation wird von Stone, Webster u. Gurdjian als „relative Hypoxie" bezeichnet. Davis, McCulloch u. Roseman fanden bei einem solchen durch eine generalisierte Erregung hervorgerufenen Zustand eine Erniedrigung der Sauerstoffspannung in den Zellen auf 35—75% des Wertes, der sich bei kurzer Beatmung mit reinem Stickstoff einstellt.

Treten bei der Generalisierung der Erregung tonisch-klonische Konvulsionen auf, so kommt es zu einer Erhöhung des peripheren O_2-Verbrauchs, der bis zum 50fachen der Norm gesteigert sein kann. Ein Krampf der Atemmuskulatur und der Spasmus der Stimmritze können darüber hinaus zu einer verminderten O_2-Aufnahme in der Lunge führen. Die sich dadurch ergebende allgemeine Hypoxämie vergrößert den im ZNS bereits bestehenden Sauerstoffmangel. Die Verarmung der Zelle an Sauerstoff über eine bestimmte Grenze hinaus führt aber, wie Versuche mit experimentell herbeigeführter Anoxie und Ischämie gezeigt haben, zu einer Abnahme der energiereichen Phosphatverbindungen (Thorn, Pfleiderer, Frowein u. Ross; Gerlach, Döring u. Fleckenstein; Burdette; Jordan u. Gray).

Auf die im Verlauf der Erregung zunehmende zentrale Hypoxie wird von einigen Autoren auch der Übergang der tonischen Phase eines Krampfes in das klonische Stadium, sowie schließlich das Aufhören der Krampfentladungen zurückgeführt (Ruf; Gellhorn u. Heymans; Gurdjian, Webster u. Stone; R. Jung (1950). Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß selbst bei starker zentraler Erregung stets mehr als die Hälfte des ATP-Gehaltes erhalten bleibt. Außerdem hat sich gezeigt, daß nach Erniedrigung der ATP-Konzentration um etwa 20% die Auslösung eines Cardiazolkrampfes unverändert möglich ist. Der Mangel an Energie allein kann daher keine hinreichende Erklärung für die Beendigung der Krämpfe liefern. Wahrscheinlich sind daran auch Prozesse beteiligt, die eine bremsende Wirkung auf den Ablauf der generalisierten Erregung ausüben. Zentrale Erregungen allein rufen keine Abnahme der energiereichen Nucleotide hervor, wenn die krampfhemmenden Hexachlorcyclohexane den Ausbruch der Konvulsionen verhindern, obgleich unter diesen Bedingungen typische synchrone Krampfpotentiale, die R. Jung (1949) als Uhrwerkstadium bezeichnet hat, im EEG zu beobachten sind (Coper, Herken, Rosenkötter, Selbach). Erst wenn tonisch-klonische Krämpfe auftreten, kommt es zu den charakteristischen Veränderungen der Nucleotidkonzentrationen, wie sie auch bei der durch Muskelrelaxantien hervorgerufenen zentralen Hypoxie gefunden werden. Auch andere Autoren beschrieben Experimente, in denen der ATP-Gehalt des ZNS trotz Gabe von Krampfgiften erhalten blieb. In diesen Versuchen wurde die Auslösung der Konvulsionen entweder durch Applikation von Relaxantien bei gleichzeitiger passiver Beatmung (Stone, Webster, Gurdjian) oder durch Verabreichung der Krampfgifte in Dosen, die nur zur Erregung, aber nicht zu den motorischen Äquivalenten führten (Palladin), verhindert.

Schließlich benötigen aber auch die durch die Erregung unmittelbar ausgelösten Stoffwechselvorgänge, besonders die Restitutionsprozesse,

vermehrt chemische Energie. So beschrieb Muntz die Mitwirkung von ATP bei der Freisetzung von Ammoniak im Zentralnervensystem. Auch die Wiederherstellung einer normalen Zellkonzentration von Kalium, Natrium und Milchsäure, um nur einige der Substanzen zu erwähnen, deren Konzentration sich während der generalisierten Erregung ändert, geht mit einem erhöhten Umsatz energiereicher Nucleotide einher.

Gleichgültig ob die Verminderung der energiereichen Nucleotide auf Entkopplung, Hypoxie oder energieverbrauchenden Reaktionen beruht, muß sie stets von einer Vermehrung des anorgan. Phosphats und gleichzeitiger Bildung äquivalenter Mengen der niedriger phosphorylierten Nucleotide begleitet sein. Im Experiment findet sich jedoch keine entsprechende Zunahme dieser Nucleotidfraktionen. Es wäre möglich, daß die entstandenen energiearmen Nucleotide weiter degradiert werden zu Ribosiden und Nucleobasen. Aber auch diesem Reaktionswege widersprechen die Ergebnisse der Versuche, denn die Riboside des Adenins und des Hypoxanthins, die beim Abbau der Purinnucloetide als Zwischenstufen durchlaufen werden, bleiben unverändert. Auch die Endstufen des Abbaues bis zum Allantoin, Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure, die durch ihr spektrales Verhalten im UV-Licht ohne weiteres zu erkennen sind, werden nicht gefunden.

Es ist jedoch möglich, daß eine durch die Erregung bewirkte Steigerung der Zellpermeabilität ein Abströmen der in den Zellen befindlichen Nucleotidbausteine mit dem Hirnvenenblut zur Folge hat. Darüber liegen bis jetzt keine experimentellen Befunde vor. Eigene orientierende Versuche an Hirnschnitten haben gezeigt, daß eine durch Verarmung der Inkubationsflüssigkeit an Sauerstoff herbeigeführte Steigerung der Zellpermeabilität nicht zu einem vermehrten Austritt von Nucleotidverbindungen aus der Zelle führt.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Konzentration des ATP abnimmt, ohne daß die niedriger phosphorylierten freien Nucleotide auftreten, wenn unter Einbeziehung des Nucleotidmoleküls eine Synthese von Verbindungen stattfindet, die nicht mehr säurelöslich sind. Hierbei kommt es dann nur zur Vermehrung des anorganischen Phosphates. Das bei der generalisierten Erregung beobachtete Verschwinden eines Teiles der säurelöslichen Nucleotide ließe sich durch eine solche Reaktionsweise erklären. Diese bereits vor einiger Zeit geäußerte These (Koransky 1956) wird gestützt durch die Arbeiten von Geiger, Yamasaki u. Nebel, die bei der generalisierten Erregung einen vermehrten Einbau von Adenin und Guanin in die Nucleinsäuren und eine Abnahme des säurelöslichen Stickstoffes fanden. Weitere Argumente dafür brachte die Arbeit von Heald, der Hirnschnitte mit radioaktivem Phosphat inkubierte. Bei elektrischer Reizung dieser Schnitte kam es zu einer Erhöhung der Einbaurate des aktiven Phosphates in die säureunlösliche Fraktion des Gewebes.

Über den Mechanismus des Einbaues monomerer Nucleotide in Polynucleotide wurden in der letzten Zeit neue Erkenntnisse gewonnen. So haben Brummond, Staehelin u. Ochoa; Beers; Littauer u. Kornberg sowie Bessmann, Lehmann, Simms u. Kornberg die Bildung von Polynucleotiden durch Polymerisation monomerer Nucleotid-di- und triphosphate durch Bakterienenzyme beschrieben. Canellakis konnte inzwischen auch einen Einbau von Nucleotiden in Ribonucleinsäuren unter der Wirkung eines aus Warmblüterorganen gewonnenen Enzyms demonstrieren.

Die Tatsache, daß neben ATP auch GTP und UTP in gleicher Weise abnahmen, ohne daß die niedriger phosphorylierten Verbindungen zunehmen, ließe sich dementsprechend auf eine analoge Reaktionsweise dieser Nucleotide zurückführen.

Eine solche Bildung von Polynucleotiden könnte sowohl durch den diskutierten Sauerstoffmangel im Zentralnervensystem ausgelöst als auch durch den Erregungsvorgang selbst angeregt werden. Die bisher bekannten Tatsachen über die Polymerisation monomerer Nucleotide lassen erkennen, daß es sich bei diesen Reaktionen, die von der Di- und Triphosphatstufe ausgehen, um reversible Prozesse handelt. Das bedeutet, daß die in den Monomeren enthaltene Energie im wesentlichen in den Polymeren erhalten bleibt. Eine verminderte Phosphorylierung bei Sauerstoffmangel und die gleichzeitige Polymerisation monomerer Nucleotide würde zwanglos eine Erklärung dafür geben, daß der beobachteten Abnahme der Triphosphate keine äquivalente Zunahme der Monophosphate entspricht. Die allgemein beschriebene Zunahme des anorganischen Phosphates würde bei dem hier angenommenen Vorgang ebenfalls zu finden sein.

Eine Interferenz solcher Prozesse mit einer gleichzeitig ablaufenden Dephosphorylierung der energiereichen Phosphate könnte auch das verschiedene Verhalten des AMP bei der Einwirkung der einzelnen Krampfgifte erklären. Je nachdem, welche der beiden Vorgänge bis zum Dekapitieren der Tiere überwiegt, würde sich Abnahme oder Zunahme des AMP zeigen. Eine eindeutige Klärung dieser Fragen wird jedoch nur unter Zuhilfenahme von radioaktiv markierten Nucleotiden möglich sein.

Die mitgeteilten Befunde zeigen, daß beim *Ablauf* und als *Folge* eines generalisierten Krampfanfalles Änderungen der Nucleotidkonzentrationen im Gehirn auftreten. Sie gestatten jedoch nicht zu entscheiden, ob spezifische Reaktionen im Nucleotidstoffwechsel auch für das *Zustandekommen* der Erregung ursächliche Bedeutung haben. Hierbei muß besonders an einen Wegfall bremsender Funktionen gedacht werden, die eine Ausbreitung der Erregung unter normalen Bedingungen verhüten und den Warmblüterorganismus gegen generalisierte Krampfanfälle schützen. Es existieren Befunde, die eine Beteiligung von Nucleotiden bei der Auslösung erregungshemmender oder -bremsender Vorgänge wahrscheinlich machen. Solche steuernden Mechanismen im ZNS sind vielfach

diskutiert worden, und ihre Existenz kann durch elektrophysiologische Untersuchungen als gesichert gelten (R. Jung; Schütz u. Caspers; Grundfest). Torda 1953b hat elektroencephalographisch festgestellt, daß ATP die erregende Wirkung von Cardiazol abschwächt. In eigenen Experimenten (Coper, Herken, Koransky 1954) konnte die Injektion von Adenosintetraphosphat die abgelaufene krampfhemmende Wirkung der HCH wiederherstellen. Dagegen hatte reines ATP unter gleichen Bedingungen keinen Einfluß auf die Erregbarkeit des ZNS (Koransky 1957; Coper, Herken, Koransky 1958). Auch die nach Applikation von HCH beobachtete Vermehrung der 4. Fraktion im Papierchromatogramm gewinnt in diesem Zusammenhang eine neue Bedeutung, so daß weitere Untersuchungen über die Beteiligung der Nucleotide des Gehirns an der Steuerung zentraler Erregungen notwendig sind.

Fräulein Ingeborg Klempau und Herrn Gerhard Münch danken wir für ihre wertvolle Hilfe bei den Versuchen.

Abkürzungen

As = Adenosin
AMP = Adenosin-5′-monophosphat
ADP = Adenosin-5′-diphosphat
ATP = Adenosin-5′-triphosphat
ATTP = Adenosin-5′-tetraphosphat
GMP = Guanosin-5′-monophosphat
GDP = Guanosin-5′-diphosphat
GTP = Guanosin-5′-triphosphat
FAN = Flavinadeninnucleotid
UMP = Uridin-5′-monophosphat
UDP = Uridin-5′-diphosphat
UTP = Uridin-5′-triphosphat
IMP = Inosin-5′-monophosphat
DPN = Diphosphopyridinnucleotid
TPN = Triphosphopyridinnucleotid
Co A = Co-Enzym A
HCH = Hexachlorcyklohexan

Summary

1. The acid soluble nucleotides of rat brain have been separated by paper- and ionexchange-chromatography and the concentrations of them estimated under various states of brain function.

2. A decrease of di- and tri-phosphates of adenosine, guanosine and uridine has been established during convulsions which were induced by metrazol, paraxone and scillirosid. No equivalent increase of the corresponding mono-phosphates has been found. There is even no increase of other metabolites such as ribosides or nucleobases.

3. After the administration of benzenehexachlorides which have a long lasting anticonvulsive action small differences appear in the concentration of mono-, di- and tri-phosphates. By paperchromatography a remarkable increase of the arbitrary called "fourth fraction" which consists of several compounds is observed upon application of β- and γ-benzenehexachloride. This cannot be demonstrated however in ionexchange-chromatograms because these compounds, which partly exist only in small amounts for example TPN, Co-A and FAN are distributed to several bands.

4. During simultaneous action of HCH and metrazol no change of the nucleotides occurs as long as convulsions are prevented by HCH although in the EEG typical signs of convulsive seizures can be observed. But if the animals get tonic-clonic convulsions then the typical changes in nucleotide-concentration take place.

5. Under oxygen deficiency of the central nervous system the changes resemble those during convulsions.

6. The results are discussed in as much uncoupling, oxygen deficiency of central nervous system, processes of restitution or other metabolic reactions accompanying convulsions are responsible for the described changes.

7. It has been taken into consideration that some of the disappeared nucleotides might be used for the formation of polynucleotides which occurs during convulsions. Furthermore the possibility is reviewed that nucleotides are involved in the physiological process to diminish excitability.

Literatur

Abood, L. G., R. W. Gerard and R. D. Tschirgi: Phosphorus Metabolism. A Symposium Vol II S. 798 (1952). The John Hopkins Press.

Bain, J. A., and G. H. Pollock: Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. **71**, 495 (1949).

Bain, J. A., G. H. Pollock and S. N. Stein: Proc. Soc. exp. Biol. **71**, 497 (1949).

Barnum, C. P., C. W. Nash, E. Jennings, O. Nygaard and H. Vermund: Arch. Biochem. (Lond.) **25**, 376 (1952).

Beers, R. F.: Nature **177**, 790 (1956).

Berenblum, J., and E. Chain: Biochem. J. **32**, 295 (1938).

Bessmann, N. J., E. S. Simms and A. Kornberg: Fed. Proc. **16**, I 153 (1957).

Birkofer, L., in Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der physiol.- und pathol.-chem. Analyse 1955, Bd. III, S. 1339.

Brummond, D. O., M. Staehelin and S. Ochoa: J. biol. Chem. **225**, 835 (1957).

Burdette, W. J.: Amer. Heart J. **52**, 193 (1956).

Canellakis, E. S.: Biochim. biophys. Acta **23**, 217 (1957).

Canellakis, E. S.: Biochim. biophys. Acta **25**, 217 (1957).

Carter, C. E.: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1466 (1950).

Cohn, W. E.: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1471 (1950).

Coper, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 143 (1956).

Coper, H., H. Herken u. I. Klempau: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **212**, 463 (1951).

Coper, H., H. Herken u. I. Klempau: Naturwissenschaften **1951**, S. 38.

Coper, H., H. Herken, L. Rosenkötter u. H. Selbach: Klin. Wschr. **1952**, S. 551.

Coper, H., H. Herken u. W. Koransky: Naturwissenschaften **1954**, S. 531.

Coper, H., H. Herken u. W. Koransky: im Druck 1958.

Davies, P. W., and D. W. Bronk: Fed. Proc. **16**, 689 (1957).

Davis, E. W., W. S. McCulloch and E. Roseman: Amer. J. Psychiat. **100**, 825 (1944).

Dixon, J. S., and D. Lipkin: Analyt. Chem. **26**, 1092 (1954).

Elliot, K. A. C., R. L. Swank and N. Henderson: Amer. J. Physiol. **162**, 469 (1950).

Eggleston, L. V., and R. Hems: Biochem. J. **52**, 156 (1952).
Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 531 (1953).
Geiger, A., and G. Magnes: Amer. J. Physiol. **149**, 517 (1947).
Geiger, A., J. Yamasaki and L. Nebel: Fed. Proc. **16**, I 44 (1957).
Gellhorn, E., and C. Heymans: J. Neurophysiol. **11**, 261 (1948).
Gerard, W.: Neurochemistry, Charles C. Thomas Publ. Springf. 1955, S. 475.
Gerlach, E., H. J. Döring u. A. Fleckenstein: Pflüger's Arch. ges. Physiol. **266**, 266 (1958).
Grenell, R. G.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **66**, 826 (1957).
Grundfest, H.: Physiol. Rev. **37**, 337 (1957).
Gurdjian, E. S., J. E. Webster and W. E. Stone: Ass. Res. nerv. Diss. Proc. **26**, 184 (1946).
Heald, P. J.: Biochem. J. **63**, 242 (1956).
Herken, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **211**, 143 (1950).
Herken, H., u. D. Neubert: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 223 (1953).
Herken, H., H. Kewitz u. I. Klempau: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 217 (1952).
Hunter, F. E., and O. H. Lowry: Pharmacol. Rev. **8**, 889 (1956).
Hurlbert, R. B., H. Schmitz, A. F. Brumm and V. J. Potter: J. biol. Chem. **209**, 23 (1954).
Jordan, W. J., and I. Gray: J. biol. Chem. **215**, 669 (1955).
Jung, R.: Arch. Psychiat. Nervenkr. **183**, 206 (1949).
Jung, R.: Z. ges. Neurol. Psychiat. **185**, 701 (1950).
Klein, J. R., and N. S. Olson: J. biol. Chem. **167**, 747 (1947).
Koransky, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 140 (1956).
Koransky, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 266 (1957).
Koransky, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **234**, 46 (1958).
Le Page, G. A.: Amer. J. Physiol. **146**, 267 (1946).
Littauer, U. Z., and A. Kornberg: J. biol. Chem. **226**, 1077, (1957).
Löfgren, N.: Acta chem. scand. **6**, 1030 (1952).
Lowry, O. H., N. R. Roberts and J. I. Kapphahn: J. biol. Chem. **224**, 1047 (1957).
Lynen, F., u. K. Decker: Ergebn. Physiol. **49**, 327 (1957).
Marshak, A., and H. J. Vogel: J. biol. Chem. **189**, 597 (1951).
Mejbaum, W.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **258**, 117 (1939).
Muntz, J. A.: J. biol. Chem. **201**, 221 (1953).
Opitz, E.: Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes. 3. Colloquium d. Ges. f. Physiol. Chem. 1952.
Opitz, E., u. M. Schneider: Ergebn. Physiol. **46**, 149 (1950).
Palladin, A. W.: Wien klin. Wschr.. **1954** S. 473.
Quastel, J. H.: Neurochemistry, Charles C. Thomas Publ. Springt. 1955, S. 648.
Richter, D., J. and Crossland: Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949).
Richter, D., and R. M. C. Dawson: J. bio. Chem. **176**, 1194 (1948).
Rothlin, E., et W. R. Schalch: Helv. physiol. pharmacol. Acta **10**, 427 (1952).
Ruf, H.: Nervenarzt **1950**, 109.
Schmidt, C. F., S. S. Kety and H. H. Pennes: Amer. J. Physiol. **143**, 33 (1945).
Schmitz, H., R. B. Hurlbert and V. R. Potter: J. biol. Chem. **209**, 41 (1954).
Schütz, E., u. H. Caspers: Dtsch. Z. Nervenheilk. **176**, 293 (1957).

Stone, W. E.: J. biol. Chem. **135**, 43 (1940).
Stone, W. E.: Neurochemistry, Charles C. Thomas Publ. Springf. 1955, S. 499.
Stone, W. E., J. F. Webster and E. S. Gurdjian: J. Neurophysiol. **8**, 233 (1945).
Thorn, W., G. Pfleiderer, R. A. Frowein u. J. Ross: Pflügers Arch. ges. Physiol. **261**, 334 (1955).
Toman, J. E. P., and C. S. Goodman: Physiol. Rev. **28**, 409 (1948).
Torda, C.: Amer. J. Physiol. **173**, 179 (1953).
Torda, C.: Amer. J. Physiol. **178**, 123 (1954).
Weill-Malherbe: Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes, 3. Colloquium d. Ges. f. Physiol. Chem. 1952.
Wirth, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **207**, 547 (1949).
Wladimirow, G. J.: Funktionelle Biochemie des Gehirnes. Berlin: VEB-Verlag Volk u. Gesundheit 1954.
Wortis, S. B., D. Shaskan, D. Impastato and R. Alimansi: Amer. J. Psychiat. **98**, 354 (1941/1942).

Professor Dr. med. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 474—489 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Pharmakologische Untersuchungen bei der experimentellen Leberverfettung

Von

DIETER MAIBAUER, DIETHER NEUBERT und HELMUT ROTTKA

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Juli 1958)

Bei der Untersuchung der pharmakologischen Wirkung des Methionin-Antagonisten Äthionin an der Ratte fiel ein deutlicher Geschlechtsunterschied bei der akuten Vergiftung auf: das männliche Tier erwies sich als resistenter, während das Weibchen wesentlich empfindlicher war und im Gegensatz zum Männchen mit einer erheblichen Leberverfettung reagierte. Beim Männchen war dagegen die Verfettung nur gering ausgeprägt. Sowohl bei der Leberverfettung nach Äthioningabe als auch bei andersartiger Leberschädigung (CCl_4, P, Diät) konnte ein Aktivitätsverlust bestimmter Enzyme in den Lebermikrosomen nachgewiesen werden, die für den Abbau einer Reihe von Pharmaka wichtig sind.

Eine Aktivitätsminderung dieser Fermentsysteme konnte auch mit einigen Phenylessigsäurederivaten erzielt werden. Bei anderen Abkömmlingen der Phenylessigsäure wurde ein Effekt auf den Fett- und Cholesterinstoffwechsel beschrieben. Es ist bisher nicht bekannt, ob ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Wirkungen besteht.

In dieser Arbeit soll zu folgenden Fragen Stellung genommen werden:

1. Ist das Ausmaß der Leberverfettung bei beiden Geschlechtern nur nach Gabe von Äthionin verschieden oder treten deutliche Unterschiede auch nach Gabe anderer Stoffe, die zur Verfettung führen, auf?

2. Bestehen Beziehungen zwischen der Hemmung der „Mikrosomenfermente" und dem Grad der Leberverfettung?

3. Lassen sich die in der Literatur beschriebenen Wirkungen der Phenyl*äthyl*essigsäure auf den Fett- (und Cholesterin-)stoffwechsel bestätigen? Kommt auch der Phenyl-*diallyl*essigsäure und ihrem Diäthylaminoäthanolester (CFT 1201), der einen starken Aktivitätsverlust der Mikrosomenfermente bewirkt, eine solche Wirkung zu?

Folgende Abkürzungen wurden benutzt:

CFT 1201	= Di*äthyl*aminoäthanolester der Phenyl*diallyl*essigsäure;
CFT 1214	= Di*methyl*aminoäthanolester der Phenyl*diallyl*essigsäure;
CFT 1208	= Di*äthyl*aminoäthanolester der Phenyl*allyl*essigsäure;
SKF 525 A	= Di*äthyl*aminoäthanolester der Diphenylpropylessigsäure;
PhdaE	= Phenyl*diallyl*essigsäure (Na-Salz);
PhäE	= Phenyl*äthyl*essigsäure (Na-Salz).

Methodik

Es wurden etwa 900 männliche und weibliche Albinoratten im Gewicht von 110—140 g verwandt. Die Tiere erhielten ein genau standardisiertes Trockenfutter[1]. Am letzten Tag vor der Dekapitation erhielten alle Tiere mit Ausnahme der Ratten in den Diätversuchen keine Nahrung mehr. Wasser ad libitum.

Die Gabe eines geeigneten und in seiner Zusammensetzung konstanten Futters während der Versuchszeit halten wir bei derartigen Untersuchungen für *sehr wichtig*. Früher von uns mit Äthionin durchgeführte Versuche, bei denen Küchenabfälle eines Krankenhauses an die Ratten verfüttert wurden, ergaben Resultate, die von den hier beschriebenen stark abwichen. So lagen z.B. bereits die Gesamtfettwerte bei normalen Tieren recht hoch und der (an sich sehr ausgeprägte) Geschlechtsunterschied nach Äthionin-Applikation war in einigen Versuchsreihen kaum vorhanden. Die — in vielen Kliniken übliche — Fütterung von Versuchstieren mit Küchenabfällen ist nach unseren Erfahrungen für exakte Stoffwechseluntersuchungen völlig ungeeignet! Man wird sich bei derartigen Untersuchungen zur Verabfolgung eines standardisierten Futters entschließen müssen.

Die Ratten wurden mit Scherenschlag dekapitiert, die Lebern nach dem Ausbluten herauspräpariert, gewogen und sofort tiefgefroren (—20° C). Die gefrorenen Lebern wurden (nach der modifizierten Methode von Farber, Simpson u. Tarver 1950) mit wasserfreiem Natriumsulfat im Porzellanmörser zu einem feinen trockenen Pulver zerrieben, mit Chloroform extrahiert und die Gesamtfette gravimetrisch bestimmt. Der Fettgehalt wurde meist in Prozent des Leber*feucht*gewichtes angegeben. Wir haben hierbei aus versuchstechnischen Gründen eine gewisse Ungenauigkeit in Kauf genommen. Das Lebergewicht steigt bei den verschiedenen Schädigungen an, jedoch ist die Gewichtszunahme nicht auf den vermehrten Fettgehalt allein zurückzuführen. Wahrscheinlich ist hierfür auch ein vermehrter Wassergehalt (Ödem) verantwortlich zu machen. Diese Verhältnisse sind für die von uns benutzten Stoffe am Beispiel der weiblichen Tiere in der Tab. 1 zusammengestellt. Es zeigt sich, daß eine strenge Parallelität zwischen dem Fettgehalt und dem Feuchtgewicht nicht besteht. Bei einer Gewichtszunahme von weniger als 10—12% haben wir keine Korrektur vorgenommen. Nur bei der diätetischen Verfettung ist der Anstieg höher. Deshalb wurden die Fettwerte hier auf das Lebergewicht der Kontrollen bezogen (z. B. Abb. 1).

Die *Cholesterin-Bestimmung* erfolgte nach der von Mertens u. Albers (1953) modifizierten Methode von Schönheimer u. Sperry (1934). Statt des angegebenen Zeiss-Photometers kam das Beckman-Spektralphotometer DU zur Anwendung (Wellenlänge 660 mμ). Die gefundenen Mengen Cholesterin wurden auf das mittlere Lebergewicht der Kontrolltiere bezogen.

Die Bestimmung der Schlafzeit (Evipan) und der Aktivität der „Mikrosomenfermente" wurde früher beschrieben (Herken, Maibauer u. Neubert 1958).

Dosierung und Applikation:

1. Äthionin: einmalig 500 mg/kg intraperitoneal einer 2%igen wäßrigen Lösung.
2. Tetrachlorkohlenstoff: einmalig 3 ml/kg subcutan.

[1] Das Futter setzt sich zusammen aus: Weizen-, Gersten-, Hafer-Vollkornschrot, Sojaschrot, Trockenfleisch, Magermilchpulver, Futtertrockenhefe, Fischmehl, Fischsolubles, Luzernegrünmehl, Futterknochenschrot, Dorschlebermehl, kohlensaurer Futterkalk, Zusatz von Weizenkeimöl (Hersteller: Märkische Kraftfutterwerke Berlin).

3. Phosphor: einmalig 6,25 mg/kg einer 0,125% Lösung in Paraffinum liquidum (mit Äther stabilisiert) oral durch die Schlundsonde.

4. Diät: Je Tier wurden etwa 12 g Trockenfutter berechnet. Die verschiedenen Bestandteile der Nahrung (alle pulverisiert) wurden mit Wasser täglich gekocht.

Die Diät basiert auf Angaben von Bruun, Dam u. Schilling (1950). Sie wurde geringfügig modifiziert. Die Ratten erhielten 21 Tage ein Futter folgender Zusammensetzung: 84% Saccharose, 10% Casein,

Tabelle 1. *Beziehung zwischen dem Lebergewicht und dem Grad der Verfettung*
Weibliche Ratten. Die Phenylessigsäurederivate wurden an 4 Tagen vor dem schädigenden Agens oral mit der Schlundsonde verabreicht. (CFT 1201: 50 mg/kg ≙ 142 µMol/kg; +PhdaE und PhäE 142 µMol/kg; ++PhdaE und PhäE 1343 µMol/kg)

Substanzen	Mittleres Lebergewicht		Mittlerer Fettgehalt pro Leber		Zunahme des	
	in g	In Prozent der Kontrollen	in mg	in Prozent der Kontrollen	Lebergew. in mg	Leberfettes in mg
Kontrollen	5,3	100	260	100	—	—
CFT 1201+	5,4	104	335	129	100	75
Phosphor	6,1	117	435	167	800	175
CCl_4	5,9	112	660	254	600	400
CCl_4 + 1201+	5,7	108	485	182	400	225
Äthionin	6,0	113	965	370	700	705
Ä + 1201+	6,6	126	990	380	1300	730
Ä + PhdaE++	6,5	123	410	158	1200	150
Ä + PhäE++	5,9	111	710	273	600	450
Diät	8,1	154	1820	700	2800	1560
Diät + 1201+	8,6	162	1610	620	3300	1350
Diät + PhdaE+	8,5	160	1660	640	3200	1400
Diät + PhäE+	8,4	158	1590	612	3100	1330
Diät + PhdaE++	7,6	145	1470	566	2300	1210
Diät + PhäE++	7,4	141	1150	442	2100	890

4% Salzmischung (McCollum's Salt Mixture[1]) und 2% Agar-Agar, pro Woche 1160 IE Vitamin A und 16,6 IE Vitamin D. In den ersten drei Wochen wurden keine anderen Vitamine gegeben. Nach 21 Tagen erhielten die Tiere ein Futter mit einem etwas höheren Casein-Gehalt: 79% Saccharose, 15% Casein, 4% Salzmischung und 2% Agar-Agar. Dazu wurden je Tier folgende Mengen B-Vitamine täglich im Trinkwasser gegeben: 25 γ Aneurin, 30 γ Riboflavin, 50 γ Nicotinsäure, 100 γ

[1] 35,15 g Ca-Lactat 5 · H_2O; 5,28 g $CaCO_3$; 14,6 g $Ca(H_2PO_4) \cdot H_2O$; 6,45 g K_2HPO_4; 18,76 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 9,34 g NaCl; 7,19 g $MgSO_4$ anhydr.; 3,19 g Eisencitrat · 3 H_2O; 0,33 g $MnSO_4 \cdot 2\ H_2O$; 0,035 g $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 0,039 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$; 0,0009 g KJ. [Beveridge, M., u. C. Lucas: J. biol. Chem. **157**, 311 (1945)].

p-Aminobenzoesäure, 100 γ Calcium-Pantothenat, 20 γ Pyridoxin. Vitamin A und D wie in den ersten drei Wochen.

Die Phenylessigsäurederivate wurden in der jeweils angegebenen Dosierung in wäßriger Lösung oral mit der Schlundsonde appliziert.

Ergebnisse und Diskussion

I.

Das verschiedene Ausmaß der Leberverfettung bei männlichen und weiblichen Ratten nach Äthionin-Applikation ist mehrfach beschrieben worden (Farber u. Popper 1950; Farber, Simpson u. Tarver 1950; Farber, Koch-Weser u. Popper 1951; Jensen, Chaikoff u. Tarver 1951; Bollag u. Gallico 1952). In der Literatur bot sich bisher kein Anhalt dafür, daß eine derartige Geschlechtsdifferenz auch nach anderen Substanzen, die eine Leberverfettung hervorrufen, auftreten kann.

Wie Tab. 2 zeigt, *reagiert ganz allgemein die weibliche Ratte auf die gleichen Gifte mit einem stärkeren Fettanstieg in der Leber als das männliche*

Tabelle 2. *Fettgehalt (Gesamtfette) der Lebern männlicher und weiblicher Ratten nach experimenteller Leberverfettung*

	Kontrolle		Äthionin		CCl_4		Phosphor	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Mittelwert	4,2	4,9	8,0	16,1	6,5	11,7	5,6	5,7
σ	± 0,6	± 1,2	± 1,0	± 3,2	± 1,3	± 4,0	± 2,2	± 2,9
Tierzahl	45	53	15	68	34	32	24	24
Serie	1	2	3	4	5	6	7	8

Statistische Auswertung zu Tabelle 2

Versuchsserie	t	$n+n'-2$	P	Differenz
1:2	3,7	96	0,001	gut gesichert
3:4	17,4	81	0,001	gut gesichert
5:6	7,2	64	0,001	gut gesichert
7:8	2,6	46	0,01	schwach gesichert
1:3	31	58	0,001	gut gesichert
1:5	9,6	77	0,001	gut gesichert
1:7	3,0	67	0,0027	gut gesichert
2:4	27	119	0,001	gut gesichert
2:6	9,4	83	0,001	gut gesichert
2:8	4,3	75	0,001	gut gesichert

Tier. Dabei ist der graduelle Geschlechtsunterschied in der Ausbildung der Leberverfettung bei den einzelnen Substanzen verschieden groß. Bei der Äthionin-Leberverfettung ist er so beträchtlich, daß er fast allen

Autoren auffiel; bei den anderen Stoffen ist er geringer, aber doch deutlich.

Die gleiche Tendenz ist bei der Diätverfettung zu erkennen. Die Einzelwerte sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da von den Männchen nur ein relativ geringes Tiermaterial zur Auswertung gelangte. Auch der Leberfettgehalt normaler Tiere ist bereits bei weiblichen Ratten signifikant höher als bei männlichen. Diese Tatsache ist bisher in der Literatur nicht diskutiert worden. Eine Durchsicht entsprechender Tabellen anderer Autoren (Jensen, Chaikoff, Tarver 1951; Farber, Koch-Weser, Popper 1951) zeigt jedoch auch dort, daß die aus Lebern weiblicher Tiere extrahierte Fettmenge mehr oder weniger stark über der männlicher Tiere liegt.

Den Geschlechtsunterschied haben Farber, Koch-Weser u. Popper (1951) sowie Farber u. Segaloff (1955) für die Äthioninvergiftung näher untersucht. In ihren Versuchen verhielten sich männliche kastrierte Ratten hinsichtlich der Leberverfettung nach Äthionin wie weibliche Tiere, sofern die Kastration länger als 14 Tage zurücklag. Wurde diesen Tieren Testosteron gegeben, so entwickelte sich nach Äthionin nur eine geringgradige Leberverfettung. Weibliche Ratten, die männliches Sexualhormon bekommen hatten, reagierten wie Männchen, d. h. nach Äthionin-Applikation wiesen die Lebern nur einen mäßigen Fettanstieg auf.

Auffällig ist dabei, daß das Testosteron längere Zeit gegeben werden mußte, um eine Schutzwirkung gegen Äthionin zu erzielen. Erst nach siebentägiger Zufuhr schützte es die Leber; drei Tage lang verabfolgt blieb es wirkungslos.

Die Autoren glauben diesen Schutzmechanismus auf den „eiweißsparenden Effekt" des männlichen Sexualhormones zurückführen zu können.

Eine weitere mögliche Ursache für die Geschlechtsdifferenz der Äthioninwirkung kann auch in dem besonderen Steroidstoffwechsel der Ratte begründet sein, der noch für andere geschlechtsbedingte Stoffwechselunterschiede verantwortlich gemacht wird. Remmer (1957) nimmt an, daß bestimmte Steroide der Nebennierenrinde besonders in der Leberzelle des männlichen Tieres die Entgiftung einiger Pharmaka fördern.

Obwohl die Ausbildung einer Leberverfettung auf unterschiedliche Noxen zurückgeführt werden kann, bleibt die morphologisch sichtbare Antwort immer die gleiche: Fettanreicherung in der Leber.

Allgemein führt eine „Aminosäureimbalanz" (Lang 1957) — z. B. Mangel an Methionin, Tryptophan, Lysin, Threonin und Histidin — zur Leberverfettung (Adamstone u. Spector 1950; Singal, Hazan, Sydenstricker u. Littlejohn 1953; Sidransky u. Farber 1957). Das gleiche Ergebnis läßt sich durch Diätfütterung mit sehr hohem Fettgehalt oder mit sehr niedrigem Fett- *und* Eiweißgehalt (Drill 1952) oder auch durch Hunger (Statkewitsch 1894; Ulrich 1938; Schlicht 1955) erreichen. Auch Sauerstoffmangel (Büchner 1937; Ulrich 1938; Altmann 1949), Basedowsche Krankheit (Rössle 1933), chronischer Alkoholgenuß (Connor 1938, 1939) Pankreatektomien oder Verlegung der großen Pankreasgänge (Chaikoff, Connor u. Biskind 1938; Chaikoff u. Entenman 1948; Sanes, Miller, Breson u. Geist 1950) begünstigen das Auftreten einer Leberverfettung.

McHenry u. Gavins (1940) machten eine andere interessante Beobachtung: Beim Vitamin B kann auch eine plötzliche *Erhöhung* des Vitaminangebotes zur Leberverfettung führen. Ernährt man Ratten 21 Tage Vitamin B-frei und gibt ihnen dann 7 Tage lang B-Vitamine, so entwickeln sie während dieser Zeit starke Leberverfettungen.

Wir haben diese Art der Leberverfettung mit in unsere Untersuchungen einbezogen, weil der hierbei zugrunde liegende Mechanismus offenbar von dem der „Lebergifte" abweicht. Die Tiere, die in den ersten drei Wochen stark an Gewicht abgenommen haben, zeigen nach der Vitamin B-Zulage einen deutlichen Anstieg des Körpergewichtes, guten Appetit und Wohlbefinden. Die Leberverfettung bleibt nach unseren Erfahrungen *aus*, wenn die Tiere vor der Vitamin B-Gabe sich in einem sehr schlechten Zustand befanden.

Die Mechanismen, die im einzelnen zu einer Leberverfettung führen, sind keineswegs klar.

II.

Inwieweit Beziehungen zwischen der Hemmung der Mikrosomenenzyme und dem Ausmaß der Leberverfettung bestehen, sollte in Versuchen geklärt werden, deren Ergebnisse in Tab. 3 zusammengefaßt sind.

Tabelle 3. *Einfluß des Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthanolesters auf den Gehalt an Gesamtfetten nach experimenteller Leberverfettung* (50 mg/kg CFT 1201 oral an 4 aufeinanderfolgenden Tagen)

	♂						♀							
			Äthionin		CCl_2				Äthionin		CCl_4		Diät	
	Kontrolle	1201		+ 1201		+ 1201	Kontrolle	1201		+ 1201		+ 1201		+ 1201
M	4,2	6,1	8,0	8,9	6,5	6,5	4,9	6,2	16,1	15,0	11,7	8,5	22,5	18,7
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
σ	0,6	1,0	1,0	2,8	1,3	0,8	1,2	1,9	3,2	3,5	4,0	1,8	3,6	4,7
n	45	37	15	14	34	20	53	28	68	15	32	20	10	14
t	10,4		1,0		—		3,3		1,2		3,9		2,3	
P	< 0,0002		0,3		—		0,001		0,23		0,0003		0,028	

Die mehrfach erwähnten Geschlechtsunterschiede in der Stärke der Leberverfettung der Ratte könnten dadurch bedingt sein, daß die Lebergifte vom männlichen Tier schneller unwirksam gemacht werden. Die Mikrosomenfermentaktivität ist nämlich bei der männlichen Ratte wesentlich höher als bei der weiblichen.

In früheren Versuchen hatten wir festgestellt (Neubert 1957; Herken, Maibauer u. Neubert 1958), daß der Abbau von Evipan und Pyramidon besonders bei den Tieren verändert war, bei denen gleichzeitig eine Leberverfettung bestand. Die Frage, ob eine Parallelität zwischen dem Ausmaß der Verfettung und der Hemmung der Enzymaktivität besteht, konnte bei der angewandten Versuchsanordnung —

lediglich makroskopische Beurteilung der Leberverfettung — nicht entschieden werden.

Der Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanols (CFT 1201), der in der Lage ist, die in den Lebermikrosomen lokalisierten Fermentsysteme zu blockieren, kann bei höherer Dosierung oder bei länger dauernder Applikation ebenfalls eine Leberverfettung erzeugen (Tab. 4).

Tabelle 4. *Leberverfettung bei männlichen und weiblichen Ratten nach 7tägiger Gabe von CFT 1201 (oral)*

	♂			♀		
	50 mg/kg CFT 1201	Kontrolle	200 mg/kg CFT 1201	50 mg/kg CFT 1201	Kontrolle	200 mg/kg CFT 1201
M	6,1	4,2	11,1	6,2	4,9	12,4
	±	±	±	±	±	±
σ	1,0	0,6	3,0	1,9	1,2	3,2
n	37	45	22	28	53	18
t	9,5	10,6		3,4	9,6	
P	$< 0{,}0002$	$< 0{,}0002$		0,0007	$< 0{,}0002$	

Dies könnte ebenfalls auf eine Beziehung zwischen diesen beiden Faktoren hinweisen.

Tab. 3 zeigt, daß die Blockade der Mikrosomenfermente (MF) den Fettgehalt der Lebern der männlichen Ratten nach Äthionin- und Tetrachlorkohlenstoffgaben sowie nach Diät *nicht* ansteigen läßt.

Dieser Befund demonstriert, daß die Mikrosomenfermente für die Entgiftung des Äthionins und des Tetrachlorkohlenstoffes nicht verantwortlich sein können. Die männlichen Ratten verhalten sich nach der Blockade ihrer Mikrosomenenzyme nicht wie weibliche Tiere. Diese Tatsache stimmt mit früheren Befunden (Maibauer 1957; Herken, Maibauer u. Neubert 1958) überein: Nach Ausschaltung der Mikrosomenfermente durch CFT 1201 konnte keine Veränderung der bei der männlichen Ratte viel geringeren Toxicität des Äthionins beobachtet werden. Männliche Tiere, die CFT 1201 erhalten hatten, überlebten alle mehrfache Äthionin-Injektionen, während von den weiblichen, gleich behandelten Ratten über 70% starben.

Weiterhin kann man aus der Tab. 3 ersehen, daß auch das weibliche Geschlecht durch die Blockade der Mikrosomenfermente keineswegs stärkere Leberverfettungen entwickelt.

Um das Ausmaß der Verfettung mit dem Grad der Mikrosomenfermentaktivität in Beziehung bringen zu können, genügt keinesfalls die makroskopische Betrachtung der verfetteten Lebern. Die Farbe der Leber gibt nur sehr ungenaue Auskunft über den tatsächlichen Fettgehalt, was sich z. B. an der durch Tetrachlorkohlenstoff und Phosphor hervorgerufenen Leberverfettung besonders deutlich zeigte.

Es ist daher notwendig, das Fett zu extrahieren und gravimetrisch zu bestimmen.

Stellt man nun den in der Tab. 2 aufgeführten Fettgehalt der männlichen Rattenlebern der von HERKEN u. Mitarb. gefundenen entsprechenden Hemmung der Mikrosomenfermentaktivität gegenüber, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 5

	P	CCl_4	Äthionin	Diät
Fettgehalt der Leber in Prozent des Feuchtgewichtes	5,6	6,2	8,0	10,0
Prozent Hemmung der MF-Aktivität (Pyramidon-Abbau)	10—25%	80—90%	etwa 90%	etwa 50%

Die Äthionin-Fettleber weist den stärksten Fettgehalt auf, ihre Mikrosomenfermentaktivität ist auch am meisten beeinträchtigt; die Phosphor-Fettleber zeigt bei niedrigen Fettwerten nur eine geringe Fermenthemmung. Die durch die Diät verfetteten Lebern haben jedoch einen noch wesentlich höheren Fettgehalt als die Lebern nach Äthionin, ihre Fermentaktivität ist aber nur halb so stark gehemmt wie die der Äthionin-vergifteten Tiere. Beim CCl_4 tritt bei etwa gleich starker Fettansammlung wie beim Phosphor ein sehr starker Aktivitätsverlust der untersuchten Fermentsysteme auf. Auch innerhalb *einer* Gruppe zeigen die fettreichsten Lebern durchaus nicht immer die stärkste Abnahme der MF-Aktivität (z. B. CCl_4).

Bei allen von uns untersuchten Typen der Leberverfettung ist eine Beeinträchtigung der Aktivität der Mikrosomen-Fermente zu beobachten. *Es besteht jedoch keine klare Beziehung zwischen der Intensität der Verfettung und dem Ausmaß der Fermenthemmung.* Eine Hemmung dieser Fermentsysteme kann andererseits auch ohne gleichzeitiges Auftreten einer nennenswerten Verfettung der Leber vorhanden sein.

Die Leberverfettung nach Gaben von CFT 1201 tritt erst bei mehrfacher Applikation auf. Eine *einmalige* Gabe dieser Substanz verursacht aber bereits eine Inaktivierung der Mikrosomenfermente, welche die bei der Äthioninvergiftung deutlich übertrifft.

Es ist damit bewiesen, daß eine Parallelität zwischen Mikrosomenfermentaktivität und Ausmaß der Leberverfettung durchaus nicht vorhanden sein muß.

III.

Bei Phenylessigsäurederivaten sind zwei Wirkungen bekannt geworden: 1. die besprochene Mikrosomenfermentblockade durch die *Ester* SKF 525 A und CFT 1201; 2. ein Leberverfettung *verhütender* (WOLF

u. Kirnberger 1957) und ein Cholesterin *senkender* Effekt (Cottet et al. 1953, Garattini et al. 1955) der Phenyläthyl-essig*säure*.

Falls diesen Wirkungen eine gemeinsame Ursache zukommt, wäre zu erwarten, daß alle diese Verbindungen mehr oder weniger stark ausgeprägt, sowohl Leberverfettung verhütende als auch Mikrosomenferment hemmende Eigenschaften besitzen. Die Hemmung eines bestimmten Stoffwechselschrittes könnte nicht nur die Ursache der Blockade der Mikrosomenfermente sein, sondern letztlich auch eine Leberverfettung verhindern.

Die Wirkungen der Phenylessigsäureverbindungen auf das Ausmaß der *Leberverfettung* lassen sich aus der Abb. 1 ersehen. Allen von uns untersuchten Phenyl-Essigsäurederivaten kommt ein mehr oder weniger deutlicher Effekt auf das Ausmaß der Leberverfettung zu. Die Stärke der Wirkung ist von mehreren Faktoren abhängig:

1. spielt das die Verfettung auslösende Agens eine Rolle,

2. ist die Art und die Dosis des jeweiligen Phenyl-Essigsäurederivates entscheidend.

Die Verfettung nach CCl_4 scheint besonders leicht beeinflußbar zu sein. Schwerer zu verhindern ist das Auftreten der Äthionin-Fettleber, während die diätetisch ausgelöste Fettleber besonders resistent ist. Die Äthionin-Fettleber ist durch hohe Dosen der Phenyl-Essigsäurederivate zu beeinflussen, während die Ausbildung der Diät-Fettleber auch durch die höchsten von uns benutzten Dosen nur wenig gestört wird. Von den Phenyl-Essigsäurederivaten erscheint das CFT 1201 besonders wirksam; bereits geringe Dosen vermindern den Fettgehalt bei der CCl_4-Vergiftung deutlich. Die gleiche Dosis führt bei der Äthioninverfettung nur manchmal zu einer Verringerung des Fettgehaltes der Leber: bei einigen unserer Versuchsreihen war ein deutlicher Effekt zu beobachten, bei anderen war keine signifikante Erniedrigung nachzuweisen (Abb. 1). Sowohl die Phenyläthylessigsäure als auch die im CFT 1201 enthaltene Phenyldiallylessigsäure haben in einer Dosierung, die der des CFT 1201 äquimolar ist, bei Äthionin- und Diätverfettung keine Wirkung. Erst bei wesentlich höherer Dosierung läßt sich ein Effekt nachweisen. Das CFT 1201 kann in solchen hohen Dosen nicht appliziert werden, da es hierbei schon selbst zu einer Leberverfettung führt. Die entsprechende Säure (Phenyldiallylessigsäure) kann nicht höher als angegeben dosiert werden, da es dann zu anderen pharmakologischen Wirkungen kommt (Narkose). Bei der Phenyläthylessigsäure hingegen wurde selbst bei einer Dosierung von 1,7 g/kg(!) nur eine geringe sedative Wirkung beobachtet.

Wolf u. Kirnberger (1957) haben bei der gleichen diätetischen Verfettung eine Herabsetzung des Leberfettgehaltes bis auf Normalwerte nach Gabe von Phenyläthylessigsäure beschrieben. Die genaue von

ihnen benutzte Dosierung ist nicht festzustellen, da die Verbindung unter das Futter gemischt wurde. Die zugeführte Menge muß jedoch noch wesentlich über der von uns applizierten Dosis liegen, da wir mit 250 mg/kg

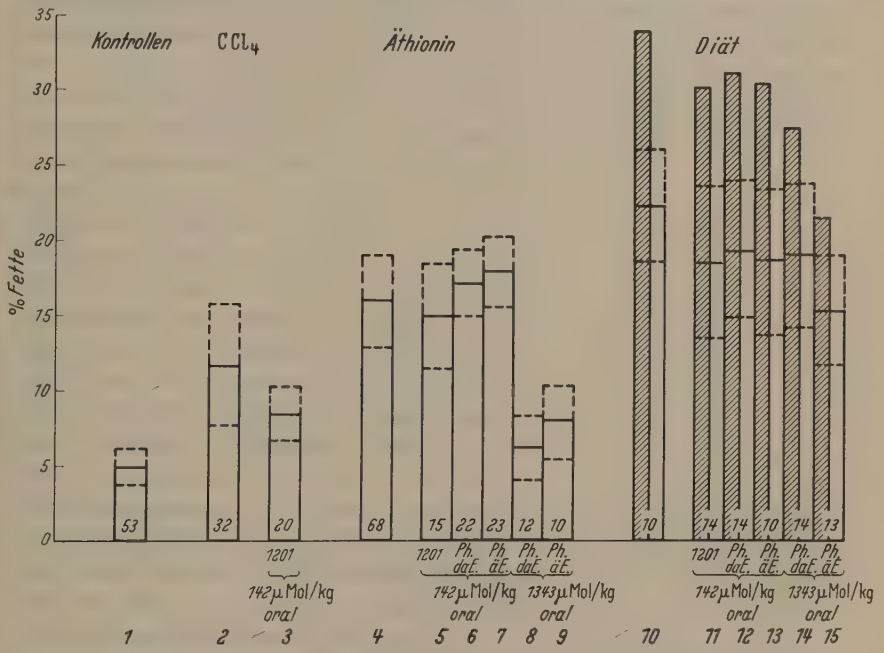


Abb. 1. Einfluß von Phenylessigsäure-Derivaten auf experimentell hervorgerufene Leberverfettungen. Weibliche Tiere. Die Phenylessigsäure-Derivate wurden in den angegebenen Dosen 4 Tage lang vor dem schädigenden Agens, bei der diätetischen Verfettung an den letzten 7 Tagen des Versuches verabreicht. Die Werte bezeichnen den Gehalt an Gesamtfetten in Prozent des Feuchtgewichtes; ▨ Gesamtfettgehalt bezogen auf das Lebergewicht der Kontrolltiere. Mittelwerte ± σ, die Zahlen in den Säulen geben die Zahl der Versuchstiere an

Statistische Auswertung zur Abb. 1

Serie	$n + n' - 2$	t	P	Differenz
2 : 3	50	3,9	0,0003	gut gesichert
4 : 5	81	1,2	0,23	nicht signifikant
4 : 8	78	13,9	< 0,0001	gut gesichert
4 : 9	76	9,8	< 0,0001	gut gesichert
10 : 11	22	2,3	0,035	nicht signifikant
10 : 12	22	1,5	0,15	nicht signifikant
10 : 13	18	1,7	0,1	nicht signifikant
10 : 14	22	1,5	0,15	nicht signifikant
10 : 15	21	3,8	0,001	gut gesichert

oral nur einen relativ geringen Effekt erzielten. Es erscheint fraglich, ob Wirkungen, die erst nach Verabreichung derartiger Mengen auftreten, eine praktische Bedeutung haben.

Wenn auch nach Gabe von Phenyläthylessigsäure-Derivaten bei der diätetischen Verfettung der Gesamtfettgehalt wenig beeinflußt wird, so

konnte eine Veränderung im Gehalt einzelner Lipoide noch nicht ausgeschlossen werden. Die Phenyläthylessigsäure ist durch ihre Wirkung auf den Serum-Cholesterin-Gehalt der Ratte bekannt geworden (Cottet, Redel, Krumm-Heller u. Tricaud 1953). Einige Untersucher wollen auch beim Menschen eine gleichartige Wirkung gesehen haben (Cottet, Mathivat u. Redel 1954; Giordano, Schiano u. Gallo 1957).

Der Arbeitskreis um Garattini, der sich in einer größeren Zahl von Arbeiten mit der Phenyläthylessigsäure beschäftigt hat, konnte eine Hemmung der Acetylierung des Coenzym A in vitro nachweisen (Garattini, Morpurgo u. Passerini 1955, 1956; Garattini, Paoletti u. Paoletti 1956; Garattini, Morpurgo, Murelli, Paoletti u. Paoletti 1957), ein Effekt, der sowohl von Steinberg u. Fredrickson (1955) als auch Wagner-Jauregg (1957) bestätigt werden konnte. Eine Reihe von Derivaten mit gleicher oder ähnlicher Wirkung sind inzwischen beschrieben worden (Garattini et al. 1956, 1957; Wagner-Jauregg 1957).

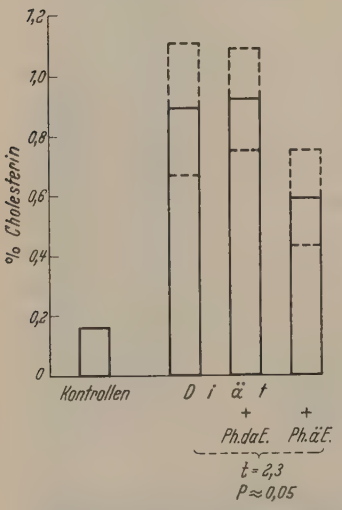


Abb. 2. Einfluß von Phenylessigsäure-Derivaten auf den Cholesteringehalt (Gesamtcholesterin) der Rattenleber nach diätetischer Leberverfettung. Weibliche Tiere, 1343 μMol/kg der Phenylessigsäure-Verbindungen wurden 7 Tage lang verabreicht

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, steigt der Cholesteringehalt der Leber nach der diätetischen Verfettung an. In den von uns benutzten, relativ hohen Dosierungen senken jedoch die Phenyläthylessigsäure, die Phenyldiallylessigsäure und das CFT 1201 die Cholesterinwerte nicht wesentlich.

Auch verschiedene andere Autoren konnten in vivo keine Cholesterinsenkung nach Phenyläthylessigsäure finden. So waren Fredrickson u. Steinberg (1956, 1957) trotz ausgesuchten Patientenmaterials und genauer diätetischer Einstellung nicht in der Lage, ein Absinken des Serum-Cholesterins in der Therapie mit dieser Substanz festzustellen.

Weiterhin wird über das Versagen der Phenyläthylessigsäure bei der Behandlung der menschlichen Hypercholesterinämie bei Grande, Anderson u. Keys (1957), Malmros u. Wigand (1955), Oliver u. Boyd (1957), sowie Schettler (1958) berichtet. Auch die Ergebnisse von Bregani u. Sachsel (1957) sind als negativ zu werten. Bei der Streuung der Methode und den spontanen Schwankungen des Serum-Cholesteringehaltes ist ein Absinken um etwa 10% nicht als Effekt eines Mittels anzusehen. In einer Reihe von Fällen ist es sogar zu einer Steigerung des Cholesteringehaltes gekommen.

Auffällig ist, daß die Blockade der Coenzym A-Acetylierung in vitro von vielen Autoren bestätigt werden konnte, bei Versuchen an lebenden Tieren und Menschen aber in den allermeisten Fällen keine überzeugende Wirkung der Phenyläthylessigsäure auf die Cholesterinkonzentration gefunden wurde. Es ist daher sehr fraglich, *ob dieses Fermentsystem in vivo nennenswert beeinflußt wird.* Steinberg u. Fredrickson (1955) konnten selbst nach langdauernder Fütterung von Phenylbutyrat (4 Wochen) bei Ratten keine Veränderungen im Coenzym A-Gehalt und der Gesamtcholesterinmenge in der Leber nachweisen.

Auch bei dem Versuch, den Effekt der Phenylessigsäure-Derivate auf die Leberverfettung mit einer Hemmung des Co-A in vivo zu erklären, stößt man auf große Schwierigkeiten: Der CoA-Gehalt ist bei der Leberverfettung bereits stark vermindert (Severi u. Fonnesu 1956), anscheinend stärker, als das überhaupt mit den Phenylessigsäure-Derivaten erreicht werden kann.

Das Versagen der Phenylessigsäuren in vivo könnte eventuell dadurch erklärt werden, daß sie nicht in genügender Konzentration in die Zelle hineinkommen und so nicht zur vollen Wirkung gelangen können. Die Annahme eines unterschiedlichen Penetrationsvermögens findet in den Ergebnissen der folgenden Versuchsreihe eine Stütze: Appliziert man die Substanzen und wählt als Test für die Aktivität der Mikrosomenfermente in vivo die Schlafzeit nach Evipan, so bekommt man eine Verlängerung der Schlafzeit nur nach Gabe des *Esters* (CFT 1201). Auch hohe Dosen der (unveresterten) Säureverbindungen bewirken keine Änderung der Schlafdauer gegenüber den Kontrollen (Abb. 3).

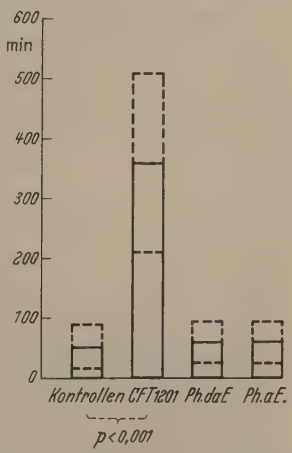


Abb. 3. Einfluß einer Vorbehandlung mit Phenylessigsäure-Derivaten auf die Schlafzeit männlicher Ratten (100mg/kg Evipan Na i.p.). Die Phenylessigsäure-Verbindungen wurden 1 Std vor der Evipangabe oral appliziert. Dosis: CFT 1201 50 mg/kg; PhdaE 480 mg/kg; PhäE 840 mg/kg

Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Brodie u. Mitarb. (1954), die bei Untersuchungen mit dem SKF 525A (Diphenylpropylessigsäureester) ebenfalls bei der entsprechenden Säure in vivo keine Schlafzeitverlängerung nachweisen konnten.

Da die gleichen Autoren jedoch bei der von ihnen untersuchten Diphenyl-propylessigsäure in vitro eine Hemmwirkung fanden, die der des Esters (SKF 525A) entsprach, schien es angebracht, auch die hier benutzten Phenylessigsäurederivate einer Untersuchung in vitro zu unterwerfen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abb. 4 zusammengestellt.

Es ist ersichtlich, daß auch der Säureanteil des CFT 1201, die Phenyldiallylessigsäure in vitro eine starke Hemmwirkung aufweist (Pyramidon-Abbau).

Neubert u. Herken (1955) hatten bei der Untersuchung verschiedener Phenylessigsäurederivate im Schlaftest wesentliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Konstitution der Verbindungen beschrieben. Die jetzt durchgeführten Experimente erlauben es, diese Befunde zu erklären.

So erwies sich z. B. der dem CFT 1201 entsprechende Ester des Di-*methyl*-aminoalkohols (CFT 1214) weniger wirksam als das CFT 1201, während er jetzt in vitro (Pyramidon-Abbau) die gleiche Wirkung zeigte. Es liegt nahe, diesen Unterschied dadurch zu erklären, daß der Ester CFT 1214 in vivo schneller gespalten wird als das bei dem Ester des Di-*äthyl*-aminoalkohols (CFT 1201) der Fall ist. Dieser Befund entspricht Untersuchungen von Levine u. Clark (1954), nach denen N-methyl-Verbindungen leichter hydrolysiert werden können als N-alkyl-Derivate mit längerer Kette. Die nach der Hydrolyse entstehende Phenyldiallylessigsäure ist, wie oben beschrieben, in vivo unwirksam.

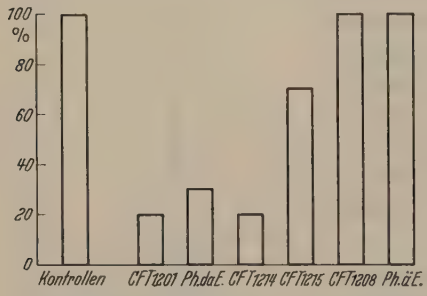


Abb. 4. Hemmung von Fermenten in den Lebermikrosomen (Pyramidon-Abbau) durch Phenylessigsäurederivate in vitro. Aktivität der „Mikrosomenfermente" in Prozent der Ausgangsaktivität. Lebermikrosomen in Zellplasma. Männliche Ratten. Alle Substanzen wurden in einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ mol zugegeben. Substratkonzentration: 4 µMol/Ansatz. Inkubationszeit: 60 min

Anders liegen die Verhältnisse bei der Verbindung CFT 1215 (dem CFT 1201 entsprechenden *Säureamid*) und CFT 1208 (Phenylallylessigsäureester), bei denen in vitro und in vivo ein gleichsinniges Verhalten gefunden wurde.

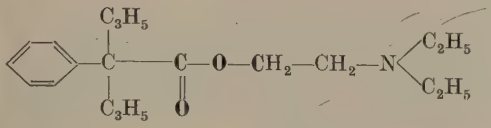
Wie bereits früher an Ratten festgestellt, geht mit dem Verlust eines Substituenten am C_2-Atom der Essigsäure bei Monophenylessigsäure-Verbindungen ein wesentlicher Wirkungsverlust, gegenüber dem Evipan-Abbau einher. Damit ist auch erklärt, daß die Phenyläthylessigsäure, bei der ebenfalls am C_2-Atom ein freies H-Atom vorhanden ist, in vitro praktisch keine Wirkung zeigt.

Die in vitro durchgeführten Versuche unterstützen die Ansicht, daß die Esterkonfiguration für das Eindringen dieser Verbindungen in die Zelle wichtig, die Substitution am C_2-Atom für die direkte Wirkung auf bestimte Mikrosomenfermente von Bedeutung ist. Für die Senkung des Leberfettgehaltes spielt die C_2-Substitution offenbar eine nur untergeordnete Rolle (Abb. 3). Ein Zusammenhang zwischen der Wirkung der

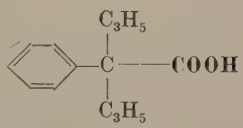
Phenylessigsäurederivate auf die Mikrosomenfermente und auf den Fett- und Cholesterinstoffwechsel ist daher wohl *nicht* gegeben.

Fräulein Gerhild Haase-Berton und Fräulein Inge Hoffmeister danken wir für ihre wertvolle und zuverlässige Mitarbeit.

Herrn Dr. Pflugk (Chemische Fabrik Tempelhof), der die CFT-Verbindungen synthetisiert hat und den Nordmark-Werken, die uns Phenyläthylessigsaures Natrium zur Verfügung stellten, danken wir für die Überlassung der Verbindungen.

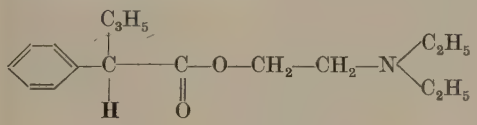


CFT 1201

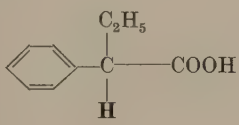


Phenyl-diallyl-essigsäure

Diäthylaminoäthanolester der Phenyldiallylessigsäure

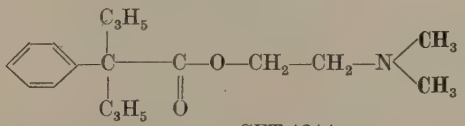


CFT 1208



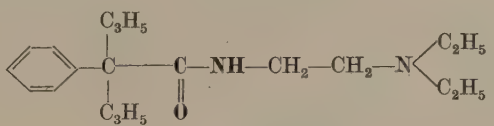
Phenyl-äthyl-essigsäure

Diäthylaminoäthanolester der Phenylallylessigsäure



CFT 1214

Dimethylaminoäthanolester der Phenyldiallylessigsäure



CFT 1215

Phenyl-diallyl-N-Diäthylaminoäthyl-acetamid

Summary

1. Remarkable quantitative differences exist between both sexes in the fatty degeneration of liver during the acute toxic action of ethionine in rats. It has been investigated by extraction and gravimetric estimation of the liver-fat whether similiar sex-differences in fatty-degeneration appear after application of other agents which are toxic to the liver.

After administration of CCl_4, phosphorus and in fatty degeneration induced by diet the concentration of fat in the liver of females is higher than in males.

Even in untreated rats there is a trend to this difference of sex. The more pronounced deposition of fat in the liver appears to be a common property of female rats rather than attributable to the specific action of ethionine.

2. In all kinds of fatty degeneration examined the activity of an enzyme-system has been deminished which is situated in liver microsomes and involved in the break-down of certain drugs.

There is no evidence for a clear cut quantitative relation between fatty degeneration and enzyme-substitution.

3. The effects of derivatives of phenyl-ethyl-acetic acid upon the concentration of fat and cholesterol in the liver has been studied and the meaning of the results is discussed.

4. The enzyme-system of liver microsomes can be inhibited in vivo by esters of phenyl-acetic acid only (CFT 1201, SKF 525A) wheras in vitro the acid component of CFT 1201 is as effective. The sodium salt of phenyl-ethyl-acetic acid however does not inhibit.

Literatur

Adamstone, F. B., u. H. Spector: Virchows Arch. path. Anat. **49**, 173 (1950).
Altmann, H. W.: Frankfurt. Z. Path. **60**, 376 (1949).
Bollag, W., et E. Gallico: Biochim. biophys. Acta **9**, 193 (1952).
Bregani, D. P., and E. Sachsel: Min. Med. **1957**, 705.
Bruun, P., H. Dam u. K. Schilling: Acta physiol. scand. **20**, 319 (1950).
Büchner, F.: Klin. Wschr. **1937**, 1409.
Chaikoff, I. L., C. L. Connor and G. R. Biskind: Amer. J. Path. **14**, 101 (1938).
Chaikoff, I. L., and C. Entenman: Advanc. Enzymol. **8**, 171 (1948).
Connor, C. L.: a) Amer. J. Path. **14**, 347 (1938). — b) J. Amer. med. Ass. **112**, 387 (1939).
Cooper, J. R., J. Axelrod and B. B. Brodie: J. Pharm. exp. Ther. **112**, 55 (1954).
Cottet, J., A. Mathivat et J. Redel: Presse méd. **62**, 969 (1954).
Cottet, J., J. Redel, C. Krumm-Heller et M. E. Tricaud: Bull. Acad. Méd. (Paris) **1953**, 441.
Drill, A.: Pharmacol. Rev. **4**, 1 (1952).
Farber, E., D. Koch-Weser and H. Popper: Endocrinology **48**, 205 (1951).
Farber, E., and H. Popper: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **74**, 838 (1950).
Farber, E., and A. Segaloff: J. biol. Chem. **216**, 471 (1955).
Farber, E., M. V. Simpson and H. Tarver: J. biol. Chem. **182**, 91 (1950).
Fredrickson, D. S., and D. Steinberg: Circulation **15**, 391 (1957).
Garattini, S., C. Morpurgo e N. Passerini: a) G. ital. Chemioter. **2**, 60 (1955). — b) Boll. Soc. ital. Biol. sper. **11**, 1653 (1955).
Garattini, S., C. Morpurgo, B. Murelli, R. Paoletti et N. Passerini: Arch. int. Pharmacodyn. **109**, 400 (1957).
Garattini, S., P. Paoletti e R. Paoletti: G. Biochim. **5**, 429 (1956).
Giordano, C., S. Schiano and D. Gallo: Min. Med. **1957**, 986.
Grande, F., J. T. Anderson and A. Keys: Metabolism **6**, 154 (1957).

Herken, H., D. Maibauer u. D. Neubert: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 139 (1958).
Jensen, D., I. L. Chaikoff and H. Tarver: J. biol. Chem. **192**, 395 (1951).
Lang, K., u. W. Kieckebusch: Klin. Wschr. **1957**, 905.
Levine, R. M., and B. B. Clark: J. Pharmacol. exp. Ther. **113**, 273 (1955).
Maibauer, D.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 234 (1957).
Malmros, H., and G. Wigand: Symp. Arterioskl. Univ. Minnesota press, 114 (1955).
McHenry, E. W., and G. Gavins: Science **91**, 171 (1940).
Mertens, E., u. C. Albers: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **293**, 244 (1953).
Neubert, D.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 235 (1957).
Neubert, D., u. H. Herken: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **225**, 453 (1955).
Oliver, M. F., and G. S. Boyd: Lancet 7000, 829 (1957).
Remmer, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 268 (1957).
Rössle, R.: Virchows Arch. path. Anat. **291**, 1 (1933).
Sanes, S., D. N. Miller, F. W. Breson and O. B. Geist: Arch. intern. Med. **85**, 980 (1950).
Schettler, G.: Dtsch. med. Wschr. **1958**, 304.
Schlicht, I.: Virchows Arch. path. Anat. **326**, 568 (1955).
Schönheimer, R., and W. M. Sperry: J. biol. Chem. **106**, 745 (1934).
Severi, C., and A. Fonnesu: Proc. Soc. exp. biol. Med. **91**, 368 (1956).
Sidransky, H., and E. Farber: Fed. Proc. **16**, 372 (1957).
Singal, S. A., S. J. Hazan, V. P. Sydenstricker and J. M. Littlejohn: J. biol. Chem. **200**, 867 (1953).
Statkewitsch, P.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **33**, 415 (1894).
Steinberg, D., and D. S. Fredrickson: a) Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **90**, 232 (1955). — b) N.Y. Acad. Sci. **64**, 579 (1956).
Ulrich, H.: Frankfurt. Z. Path. **52**, 80 (1938).
Wagner-Jauregg, T.: Experientia (Basel) **13**, 277 (1957).
Wolf, V., u. E. J. Kirnberger: Materia Medica Nordmark **5**, 184 (1957).

Dr. D. Maibauer, Dr. D. Neubert, Pharmakologisches Institut
der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 490—500 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Die Physostigminwirkung auf die Hippocampus-Tätigkeit nach Septumläsionen

Von
Charlotte Mayer und Ch. Stumpf

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Juni 1958)

Die Wirkung cholinergischer Substanzen (Physostigmin, andere Anticholinesterasen, insbesondere aus der Reihe der Alkylphosphate, sowie in die Carotis injiziertes Acetylcholin) auf das EEG ist tierexperimentell wiederholt untersucht worden. Alle diese Substanzen verursachen im präzentralen Cortex eine Desynchronisierung, im Hippocampus und in verschiedenen subcorticalen Arealen hingegen eine Synchronisierung (Regularisierung und Rhythmisierung) der bioelektrischen Tätigkeit, also EEG-Veränderungen, wie sie auch während einer „arousal reaction" beobachtet werden. Mehrere Autoren haben versucht, die Frage nach dem für die Auslösung der corticalen Desynchronisierung verantwortlichen Angriffspunkt der cholinergen Substanzen zu klären. Nach Rinaldi u. Himwich wirken cholinerge Substanzen auf das „mesodiencephale Aktivierungssystem", nach Bradley u. Key hingegen ist der Angriffspunkt des Physostigmin „mehr diffus" bzw. mit dem unspezifischen thamalocorticalen Projektionssystem in Beziehung zu bringen, und auch Longo u. Silvestrini sind der Ansicht, daß Physostigmin nicht nur auf das ascendierende retikuläre System, sondern generalisierter wirkt. Schließlich konnten Desmedt u. Mitarb. feststellen, daß Hemmkörper der Pseudocholinesterase bereits in wesentlich kleineren Dosen eine aktivierende Wirkung auf die Tätigkeit des Neocortex ausüben als Hemmstoffe der Acetylcholinesterase. Da die Pseudocholinesterase vor allem in der Neuroglia lokalisiert ist, wird aus den erwähnten Befunden geschlossen, daß durch eine Hemmung dieses Enzyms als „lokale Hormone" wirkende Cholinester des Gehirns angereichert werden und die Neurone der Großhirnrinde direkt beeinflussen. Ob die unter dem Einfluß von Anticholinesterasen auftretende Desynchronisierung der Tätigkeit des Neocortex durch eine Wirkung dieser Substanzen auf bestimmte Projektionssysteme oder auf die Großhirnrinde selbst zustande kommt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Uns interessierte speziell die Frage, ob die Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit, die nach intravenöser Injektion von Physostigmin beobachtet wird

(Sailer u. Stumpf), einer Wirkung dieser Substanz auf den Hippocampus selbst zuzuschreiben ist oder nicht. Auch hier waren beide Möglichkeiten denkbar. Einerseits fand nämlich MacLean, daß nach lokaler Injektion von cholinergen Substanzen in den Hippocampus in diesem neben Krampfpotentialen auch eine Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit auftritt; andererseits ist nach Green u. Arduini die im Rahmen einer „arousal reaction" auftretende Regularisierung der Hippocampustätigkeit, die die gleichen Charakteristica aufweist wie die Regularisierung nach Physostigminverabreichung (Sailer u. Stumpf) durch Septumläsionen aufhebbar. Zur Klärung dieser Frage haben wir daher die Wirkung von intravenös injiziertem Physostigmin auf die Hippocampustätigkeit von Kaninchen nach Zerstörung des Septum untersucht. Wir wollten mit Hilfe dieser Untersuchungen auch feststellen, ob der Hippocampus nach Septumläsionen überhaupt noch zur Produktion einer rhythmischen, regularisierten Tätgikeit fähig ist.

Methodik

Die Versuche wurden an insgesamt 20 wachen, nicht curarisierten Kaninchen im Gewicht von 2,0—2,4 kg durchgeführt. Das EEG wurde nach der von Monnier u. Laue beschriebenen Methode bilateral vom präzentralen Cortex und vom dorsalen Rhinencephalon bipolar abgeleitet und mit Hilfe eines Schwarzer-Elektorencephalographen, Type E 502, registriert. Zur Auslösung einer „arousal reaction" wurde entweder eine proprioceptive Reizung (passive Beugung und Streckung einer hinteren Extremität) oder eine elektrische Reizung des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems durchgeführt. Nähere Einzelheiten der Methodik haben wir in früheren Arbeiten (Sailer u. Stumpf, Mayer u. Stumpf) ausführlich beschrieben.

Das Septum wurde bei 18 Tieren auf elektrischem Wege und bei den 2 restlichen mechanisch mit Hilfe eines Augenmessers zerstört. Bei der Elektrokoagulation wurden zwei, bis auf 1 mm lange freie Spitzen isolierte Heßsche Nadelelektroden median 1 und 3 mm vor der Coronarnaht etwa 6—8 mm subdural eingeführt. Bei dieser Lage der Elektroden kommen deren Spitzen, entsprechend dem stereotaktischen Atlas des Kaninchengehirns nach Sawyer, Everett u. Green, median in das Septum zu liegen. Die Koagulation selbst erfolgte durch 20—30 sec langes Durchleiten eines Gleichstroms mit einer Stärke von 4,5—5 mA. Sowohl für die Reizung des ascendierenden retikulären Systems, als auch für die Elektrokoagulation des Septum wurde ein Grass-Stimulator, Modell S 4A, und für die retikuläre Reizung zusätzlich eine Grass-Stimulus Isolation Unit, Modell SIU 4A, verwendet.

Die einzelnen Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde bei jedem Tier das normale EEG während der Ruhe und während einer auf die oben beschriebene Weise induzierten „arousal reaction" abgeleitet. Dann wurde das Septum koaguliert. Etwa 1 Std später wurde wiederum das Ruhe-EEG und das aktivierte EEG beobachtet. Schließlich wurde 0,2—0,25 mg/kg Physostigminum salicylicum intravenös injiziert und der Effekt von Physostigmin auf das EEG untersucht. 5 Versuchstiere starben am 2.—3. Tag nach der Septumläsion. Bei den überlebenden Tieren wurde 7—10 Tage nach dem ersten Versuch neuerlich das EEG während der Ruhe, während einer „arousal reaction" und unter dem Einfluß von Physostigmin (in der angegebenen Dosierung) untersucht. Bei allen Tieren wurde die Lokalisation und das Ausmaß der Läsion histologisch an mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten untersucht.

Ergebnisse

Bei allen Versuchstieren bewirkte proprioceptive bzw. retikuläre Reizung vor der Septumzerstörung immer eine typische „arousal reaction": Desynchronisierung der Tätigkeit des präzentralen Cortex und Synchronisierung der Hippocampustätigkeit (Abb. 1, A II). Physostigmin

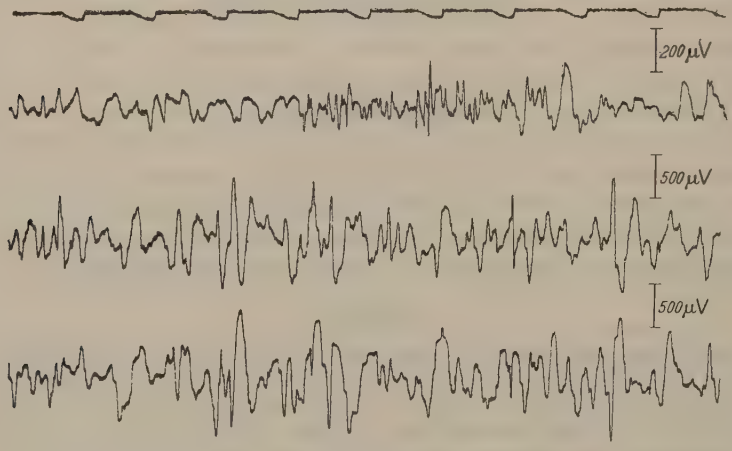


Abb. 1a (A I)

Abb. 1. Kaninchen-EEG während der Ruhe (I), während einer proprioceptiven Reizung („arousal reaction") (II) und nach i.v. Zufuhr von 0,2 mg/kg Physostigmin (III) am intakten Tier (A) und nach einer wirksamen Septumläsion (B). Ableitungen (von oben nach unten): präzentraler Cortex, linker und rechter Hippocampus. Horizontaler Balken in II: Dauer der proprioceptiven Reizung. Zeitschreibung in Sekunden. Abb. 1d—f (BI—BIII) auf S. 494/495

(0,2—0,25 mg/kg i.v.), das bei einigen Versuchen ebenfalls vor der Septumzerstörung verabreicht wurde, hatte den gleichen Effekt (Abb. 1, A III). Auf nähere Einzelheiten der Physostigminwirkung auf die Hippocampustätigkeit soll hier nicht näher eingegangen werden, da wir hierüber kürzlich ausführlich berichtet haben (Sailer u. Stumpf).

Die Zerstörung des Septum veränderte weder die spontane Tätigkeit, noch die durch die genannten Reizungen bzw. durch Physostigmin ausgelöste Desynchronisierung der Tätigkeit des präzentralen Cortex. Hingegen beeinflußte die Septumläsion in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation die Hippocampustätigkeit in verschiedener Weise. Immer und unabhängig von der Läsionslokalisation wurde jedoch die durch proprioceptive bzw. retikuläre Reizung ausgelöste rhinencephale „arousal reaction" in gleicher Weise beeinflußt, wie die pharmakologisch durch Physostigminzufuhr veränderte Hippocampustätigkeit. Waren die Läsionen in den ventralen oder lateralen Anteilen des Septum oder nur in der Nachbarschaft des Septum lokalisiert, so unterschied sich die Hippocampustätigkeit unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in keiner

Weise von der des intakten Tieres. Dieser Befund ist deswegen von Bedeutung ,weil er zeigt, daß die weiter unten beschriebenen Veränderungen der Hippocampustätigkeit nach bestimmten Septumläsionen nicht als Folge einer unspezifischen Schädigung (Hirnödem) aufgefaßt werden können. Waren hingegen die Läsionen in den dorsalen Anteilen des

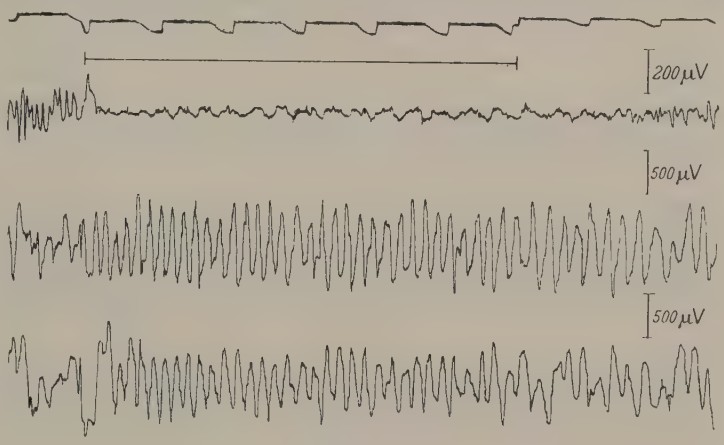


Abb. 1b (A II)

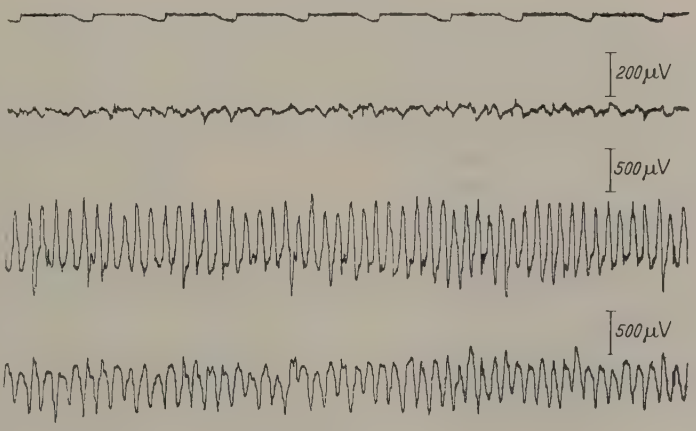


Abb. 1c (A III)

Septum median lokalisiert (Abb. 2), so traten charakteristische Veränderungen der Hippocampustätigkeit in Erscheinung. Unmittelbar nach der Koagulation nahmen die Amplituden der Hippocampustätigkeit erheblich ab; wir konnten die Erfahrung machen, daß dies eines der sichersten Merkmale für die richtige Lokalisation einer wirksamen Septumläsion

darstellt. Bei diesen Tieren zeigte der Hippocampus eine niedrige (etwa 100 μV) und relativ hochfrequente Tätigkeit; spontane Regularisierungserscheinungen, wie sie am intakten Tier häufig vorkommen, traten niemals auf (Abb. 1, BI). Proprioceptive oder retikuläre Reizung löste im Hippocampus an Stelle der normalerweise zu beobachtenden Regularisierung (Abb. 1, AII) eine Zunahme der schnellen und niedrigen (etwa

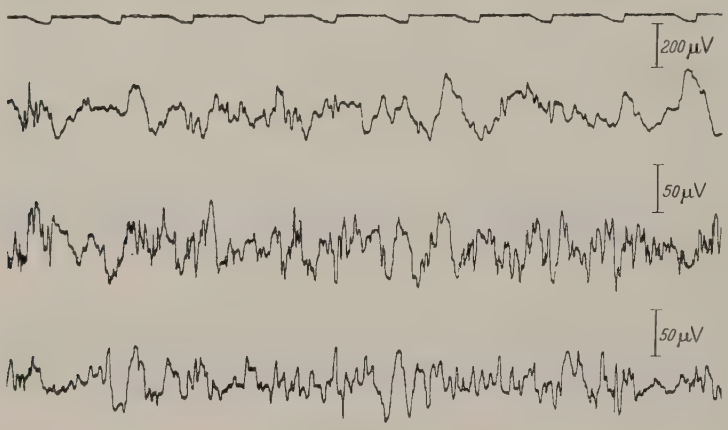


Abb. 1d (B I)

20—50 μV) Tätigkeit und einen Wegfall der langsamen Potentialschwankungen aus (Abb. 1, BII). Die bei diesen Tieren im Hippocampus auftretende Reaktion zeigte somit in vieler Hinsicht dieselben Charakteristica wie die (unveränderte) „arousal reaction" im präzentralen Cortex. Nach Physostigminverabreichung wurde die Hippocampustätigkeit wiederum in gleicher Weise verändert wie bei proprioceptiver und retikulärer Reizung (Abb. 1, BIII).

Neben diesen beiden Extremen — unveränderte Hippocampustätigkeit einerseits und völlige Aufhebung der Regularisierung der Hippocampustätigkeit während einer „arousal reaction" bzw. nach Physostigminverabreichung andererseits — konnten wir gelegentlich noch andere Reaktionsarten beobachten, die dann in Erscheinung traten, wenn die Läsion einseitig in den lateralen bzw. paramedianen Anteilen des mittleren oder dorsalen Septumteiles lokalisiert war. In diesen Fällen war sowohl nach proprioceptiver und retikulärer Reizung als auch nach Physostigminverabreichung wohl noch eine Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit nachweisbar, deren Amplituden gegenüber der Norm jedoch erheblich reduziert waren; sie betrugen etwa 100—200 μV anstatt 500—600 μV am intakten Tier. Bei einigen Tieren war diese Amplitudenverringerung der regularisierten Hippocampus-

tätigkeit der einzige erkennbare Effekt der Septumläsion, bei anderen Tieren trat gleichzeitig mit der Amplitudenverringerung auch eine Überlagerung der regularisierten Tätigkeit durch eine niedrige, hochfrequente Tätigkeit auf. Die eben beschriebenen Veränderungen der Hippocampustätigkeit traten im allgemeinen nur einseitig, und zwar auf der Seite der Septumläsion auf.

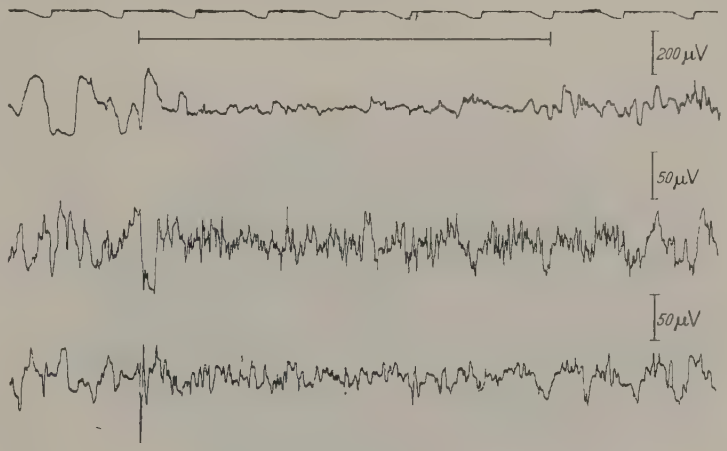


Abb. 1e (B II)

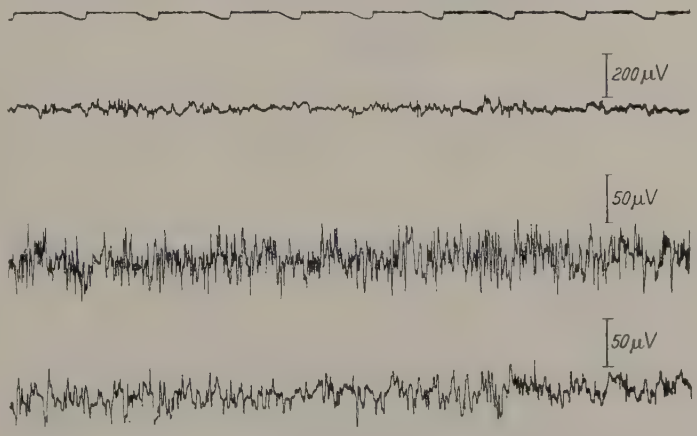


Abb. 1f (B III)

Bei den meisten Tieren waren die durch die Septumläsion ausgelösten Veränderungen der Hippocampustätigkeit im *chronischen Versuch* gleichartig ausgeprägt wie im akuten. Bei einigen Tieren konnte jedoch beobachtet werden, daß unmittelbar nach der Koagulation während

proprioceptiver bzw. retikulärer Reizung und nach Physostigminverabreichung eine niedrige Regularisierung der Hippocampustätigkeit — meist einseitig — gerade noch erkennbar war, während eine solche 7 bis 10 Tage später nicht mehr auslösbar bzw. durch eine niedrige, hochfrequente Tätigkeit ersetzt war. Die histologische Untersuchung des Gehirns dieser Tiere zeigte, daß hier die Läsion primär in lateralen Anteilen des Septum lokalisiert war, wobei der mediale Rand der Läsion die Mediane nicht erreichte, während die Gliawucherung in der unmittelbaren Umgebung der

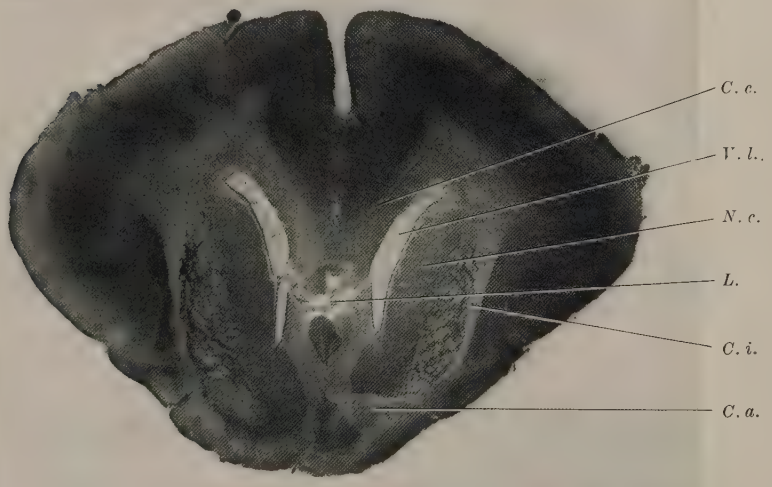


Abb. 2. Frontalschnitt durch den präcommissuralen Teil des Kaninchengehirns. Beispiel einer wirksamen Septumläsion. *C. a.* Commissura anterior; *C. c.* Corpus callosum; *C. i.* Capsula interna; *L* Läsion im Septum; *N. c.* Nucleus caudatus; *V. l.* Seitenventrikel

Läsion über die Mediane hinweg bis auf die kontralaterale Seite reichte. Alle mitgeteilten Versuchsergebnisse scheinen somit darauf hinzuweisen, daß das Septum in seinen dorsomedianen Anteilen zerstört sein muß, damit die normalerweise während einer „arousal reaction" und nach Physostigminverabreichung zu beobachtende Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit verschwindet.

Wir hatten den Eindruck, daß die Tiere, bei denen die Septumläsion eine völlige Aufhebung der Regularisierung der Hippocampustätigkeit bewirkt hatte, gewisse Verhaltensänderungen zeigten. Die auffälligste Verhaltensänderung war meist eine gesteigerte Aufmerksamkeit und Aggressivität, die sich beispielsweise darin äußerte, daß solche Tiere verschiedene, ihnen vorgehaltene Gegenstände mit ihren vorderen Extremitäten ansprangen.

Diskussion

Nach Green u. Arduini kann die durch eine rhythmische, regularisierte Tätigkeit charakterisierte rhinencephale „arousal reaction" durch Septumläsionen aufgehoben werden. In einer früheren Arbeit (Sailer u. Stumpf) konnten wir zeigen, daß intravenös injiziertes Physostigmin die Hippocampustätigkeit in praktisch gleicher Weise beeinflußt wie verschiedene Reizungen, die eine „arousal reaction" auslösen. Aus den hier mitgeteilten Versuchsergebnissen geht schließlich hervor, daß auch diese Physostigminwirkung durch bestimmte Septumläsionen aufgehoben werden kann. Läsionen im dorsomedianen Anteil des Septum können somit jede Art der Regularisierung der Hippocampustätigkeit verhindern, sei sie nun durch afferente bzw. retikuläre Reizung oder durch intravenöse Zufuhr von Physostigmin verursacht. Es hat den Anschein, als ob der Hippocampus nach derartigen Septumläsionen überhaupt nicht mehr zur Produktion einer rhythmischen, regularisierten Tätigkeit fähig wäre. In einigen orientierenden Versuchen konnten wir nämlich feststellen, daß bei Tieren mit solchen Läsionen auch Apomorphin und Methylamphetamin keine Regularisierung der Hippocampustätigkeit mehr verursachen, obwohl diese Substanzen am intakten Tier die Hippocampustätigkeit in qualitativ ähnlicher Weise beeinflussen wie Physostigmin (Brücke u. Stumpf; Brücke, Petsche, Sailer u. Stumpf; Sailer u. Stumpf).

Green u. Arduini nahmen an, daß die im Rahmen einer „arousal reaction" auftretende Regularisierung der Hippocampustätigkeit durch Verbindungen vermittelt wird, die vom Mittelhirn-Tegmentum über lateralen Hypothalamus, Septum, prä-commissuralen und dorsalen Fornix zum Hippocampus verlaufen. Diese Annahme des Vorhandenseins von für den Hippocampus afferenten Fasern im Fornixsystem steht zwar im Widerspruch zu der klassischen Ansicht von Cajal, wird jedoch durch zahlreiche neuere anatomische (Daitz u. Powell; Gerebtzoff; McLardy; Morin; Sprague u. Meyer) und elektrophysiologische Untersuchungen (Adey, Merrillees u. Sunderland; Adey, Sunderland u. Dunlop; Cragg u. Hamlyn; Green u. Adey) gestützt. Auf Grund der in dieser Arbeit mitgeteilten Versuchsergebnisse wird man annehmen dürfen, daß auch die unter dem Einfluß von Physostigmin (und von Apomorphin und Methylamphetamin) auftretende Regularisierung der Hippocampustätigkeit über die oben erwähnten Verbindungen vermittelt wird. Mit Sicherheit kann jedenfalls festgestellt werden, daß diese Regularisierung nicht einer direkten Wirkung von Physostigmin auf den Hippocampus zuzuschreiben ist. Diese Tatsache steht scheinbar im Widerspruch mit den Befunden von MacLean, der nach lokaler Injektion von cholinergen Substanzen in den Hippocampus in diesem neben Krampfpotentialen auch Regularisierungserscheinungen beobachten konnte. In diesem Zusammenhang ist jedoch die Hypothese von

Adey u. Mitarb. von Bedeutung, wonach der Hippocampus über zwei verschiedene Wege mit dem Mittelhirn in Verbindung steht: er erhält einerseits — wie bereits erwähnt — afferente Fasern über das Septum und gibt andererseits efferente Fasern über die Area entorhinalis ab. Die von MacLean beschriebene Regularisierung der Hippocampustätigkeit nach lokaler Injektion von cholinergen Substanzen könnte daher reflektorisch bedingt und ihr Auftreten könnte an die Intaktheit der erwähnten Verbindungen geknüpft sein. In Übereinstimmung mit dieser Annahme stehen — allerdings nicht unwidersprochen gebliebene (Adey, Merrillees u. Sunderland) — Befunde von Carreras, Macci, Angeleri u. Urbani, daß nicht nur Läsionen im Bereich des Septum (Green u. Arduini), sondern auch Zerstörungen der Area entorhinalis das Zustandekommen einer Synchronisierung der Hippocampustätigkeit im Rahmen einer „arousal reaction" verhindern.

Besondere Beachtung verdient unseres Erachtens noch die Tatsache, daß in unseren Versuchen bei den Tieren mit wirksamen Septumläsionen die durch proprioceptive bzw. retikuläre Reizung und durch Physostigminverabreichung auslösbare Regularisierung der Hippocampustätigkeit zwar völlig aufgehoben werden konnte, die Hippocampustätigkeit bei diesen Tieren durch die genannten Reizungen jedoch niemals unbeeinflußt blieb. In diesen Versuchen war immer die Regularisierung durch eine hochfrequente, niedrige Tätigkeit ersetzt. Für diesen Effekt gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst könnte die erwähnte Tätigkeit durch eine direkte Wirkung des Physostigmin auf den Hippocampus zustande kommen. Diese Erklärung ist jedoch unwahrscheinlich, weil afferente und retikuläre Reizung die gleiche Wirkung haben wie intravenös zugeführtes Physostigmin. Wahrscheinlicher erscheint uns hingegen die Annahme, daß die erwähnten Veränderungen der Hippocampustätigkeit über Verbindungen ausgelöst werden, deren Verlauf durch die gesetzte Läsion nicht unterbrochen wird. Am intakten Tier würde die niedrige, hochfrequente Tätigkeit durch die wesentlich höhere Regularisierung gewissermaßen überdeckt werden. Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, daß nach Ingvar und Purpura auch Anhaltspunkte dafür vorhanden sind, daß es eine extraneurale bzw. humorale Auslösung der (corticalen) „arousal reaction" gibt. Die für diese Wirkung in Frage kommenden „Neurohormone" könnten nach Purpura sein: Adrenalin, Acetylcholin, Serotonin, Cerebrotonin, Encephalin, Histamin oder die Substanz P. Inwieweit derartige Neurohormone für den von uns beschriebenen Effekt maßgebend sind, ließe sich nur an einem Tier mit einem neural komplett isolierten Hippocampus untersuchen; hierbei handelt es sich jedoch um einen Eingriff, der zumindest am Kaninchen ohne schwere Schädigung anderer Hirnteile praktisch nicht möglich ist.

Zusammenfassung

An Kaninchen mit Septumläsionen wurde die Beeinflussung der Hippocampustätigkeit durch Reizungen des aszendierenden retikulären Systems, durch proprioceptive Reizungen und durch intravenöse Physostigminverabreichung (0,2—0,25 mg/kg) untersucht.

Die Befunde von Green u. Arduini — Aufhebung der im Rahmen einer „arousal reaction" im Hippocampus normalerweise auftretenden Regularisierung und Rhythmisierung durch Septumläsionen — konnten bestätigt werden. Zusätzlich wurden im wesentlichen folgende Befunde erhoben:

1. Auch die durch intravenöse Zufuhr von Physostigmin (und von Apomorphin und Methylamphetamin) am intakten Tier im Hippocampus auslösbare Regularisierung und Rhythmisierung ist durch Septumläsionen aufhebbar. Der Hippocampus scheint nach solchen Septumläsionen überhaupt nicht mehr zur Produktion einer rhythmischen, regularisierten Tätigkeit fähig zu sein.

2. An Stelle der Regularisierung und Rhythmisierung tritt an Tieren mit Septumläsionen im Hippocampus unter dem Einfluß von Reizen, die eine „arousal reaction" bewirken, und nach Physostigminverabreichung eine niedrige, hochfrequente Tätigkeit auf, die in vielen Beziehungen der „arousal reaction" im präzentralen Cortex sehr ähnlich ist. Das Zustandekommen dieser Tätigkeit wird diskutiert.

Aus den Versuchsergebnissen wird geschlossen, daß die Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit nicht einer direkten Wirkung des Physostigmin (und des Apomorphin und Methylamphetamin) auf den Hippocampus zuzuschreiben ist.

Literatur

Adey, W. R., N. C. R. Merrillees and S. Sunderland: Brain **79**, 414 (1956).

Adey, W. R., S. Sunderland and C. W. Dunlop: Electroenceph. clin. Neurophysiol. **9**, 309 (1957).

Bradley, P. B., and B. J. Key: Electroenceph. clin. Neurophysiol. **10**, 97 (1958).

Brücke, F., u. Ch. Stumpf. In: S. Garattini and V. Ghetti: „Psychotropic Drugs." Elsevier Publishing Comp., Amsterdam, 1957. p. 319.

Brücke, F., H. Petsche, S. Sailer u. Ch. Stumpf: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **230**, 335 (1957).

Cajal, S. R.: Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. II. A. Maloine, Paris, 1911. p. 993.

Carreras, M., G. Macchi, F. Angeleri e M. Urbani: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 1 und 3 (1955).

Cragg, B. G., and L. H. Hamlyn: J. Physiol. **135**, 460 (1957).

Daitz, H. M., and T. P. S. Powell: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. **17**, 75 (1954).

Desmedt, J. E., u. L. Franken: Abst. IV. Int. Congr. Electroencephalog. Clin. Neurophysiol. a. VIII. Meeting Int. League against Epilepsie, Bruxelles, 1957. p. 148.

Desmedt, J. E,. and G. La Grutta: J. Physiol. **129**, 46 P (1955); **136**, 20 (1957).

Gerebtzoff, M. A.: J. belg. Neurol. Psychiat. **41—42**, 199 (1941—1942).
Green, J. D., u. W. R. Adey: Electroenceph. clin. Neurophysiol. **8**, 245 (1956).
Green, J. D., and A. A. Arduini: J. Neurophysiol. **17**, 533 (1954).
Ingvar, D. H.: Acta physiol. scand. **33**, 169 (1955).
Longo, V. G., and B. Silvestrini: J. Pharmacol. **120**, 160 (1957).
Mayer, Ch., u. Ch. Stumpf: Experientia **14**, 143 (1958).
MacLean, P. D.: A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **78**, 113 (1957).
McLardy, T.: J. comp. Neurol. **103**, 305 (1955).
Monnier, M., u. H. Laue: Helvet. physiol. pharmacol. Acta **11**, 73 (1953).
Morin, F.: J. comp. Neurol. **92**, 193 (1950).
Purpura, D. P.: Amer. J. Physiol. **186**, 250 (1956).
Rinaldi, F., u. H. E. Himwich: A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **73**, 396 (1955).
Sailer, S., u. Ch. Stumpf: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 63 (1957).
Sawyer, C. H., J. W. Everett and J. D. Green: J. comp. Neurol. **101**, 801 (1954).
Sprague, J. M., and M. M. Meyer: J. Anat. (Lond.) **84**, 354 (1950).

Dr. Charlotte Mayer,
Pharmakologisches Institut der Universität Wien XI./Österreich, Währingerstr. 13a

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 501—515 (1958)

Aus dem Physiologischen Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag

Die Störungen des Energieumsatzes im normalen und im denervierten Muskel bei gedrosselter Durchblutung

Von

O. Hudlická und E. Gutmann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Juli 1958)

Die Denervation des Muskels verursacht wesentliche Veränderungen im Energiestoffwechsel, die sich verhältnismäßig schnell einstellen (siehe z. B. Schapira u. Dreyfus 1950, Zubenko 1954). Fraglich ist, bis zu welchem Grade diese Veränderungen durch eine verminderte Durchblutung des Muskels bedingt ist. Da eine Reihe von Autoren für den denervierten Muskel eine erhöhte Blutströmung (z. B. Gaskell 1877, Keller, Loeser u. Rein 1930, Anrep u. Saalfeld 1935, Doupe, Barnes u. Kerr 1943, Stainsby, Fales u. Lilienthal 1956) und einen höheren Sauerstoffverbrauch angibt, ist es unwahrscheinlich, daß die Stoffwechselveränderungen primär durch eine verminderte Zufuhr des Substrats und des Sauerstoffes hervorgerufen werden. Unbekannt ist jedoch, welchen Veränderungen der Stoffwechsel im denervierten Muskel bei Sauerstoffmangel unterliegt.

Hinsichtlich des normalen Muskels wurde die Frage der Stoffwechselveränderungen bei Sauerstoffmangel eingehend studiert, besonders in Arbeiten über den sogenannten Tourniquetschock, die von einer Verminderung des Glykogen-, Kreatinphosphorsäure- und ATP-Gehalts, von einer herabgesetzten Adenosintriphosphatase- und Dehydrogenaseaktivität sowie von einem steigenden Milchsäuregehalt sprechen (Bollmann u. Flock 1944, McPherlane u. Spooner 1946, Harman u. Gwinn 1949, Fuhrmann u. Crismon 1951, Fetisova 1954, Issekutz, Hetényi u. Winter 1955 u. a.). Diese Änderungen können als ein Beweis des gestörten Energieumsatzes angesehen werden und nach McPherlane u. Spooner zu Permeabilitätsstörungen führen. Im Ionenumsatz kommt es auch wirklich zu bedeutenden Änderungen, zu einer Verschiebung des Natriums und der Chloride nach den Muskelzellen und zu einer Herabsetzung des Kaliumgehalts innerhalb der Muskelzellen (McPherlane u. Spooner 1946, Fox u. Baer 1947, Fuhrmann u. Crismon 1951, McPhee 1955 u. a.).

Die bei Applikation des Tourniquets festgestellten Veränderungen sind durch eine eventuelle Läsion des Nervenstammes und des Nachbargebietes kompliziert. Dazu kommen noch solche Veränderungen, die dem sogenannten Tourniquet*schock* zugeschrieben werden, der nach Entfernung des Tourniquets eintritt. Wir haben daher in unseren Versuchen

den veränderten Energieumsatz im normalen und im denervierten Muskel nach Drosselung der Blutzufuhr mittels Ligatur untersucht, also mit einer Methode, die zu schwächerer Ischämie, nicht aber zur Beschädigung der Nervenstämme führt.

Methodik

Die Versuche wurden an 150—200 g schweren Wistar-Ratten ausgeführt. Die Einschränkung der Blutzufuhr erfolgte durch Ligatur der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis unterhalb der Abzweigung der Art. renalis auf die Dauer von $^1/_2$—1 Std. Um die Ligatur leichter beseitigen zu können und die Gefäßwand nicht zu beschädigen, hoben wir die Gefäße mittels unterführter Silonseide, bis die Blutströmung gehemmt war. Während der Ligatur befanden sich die Tiere in Äthernarkose. Die Stoffwechseländerungen im M. tibialis anterior wurden einerseits in Serienversuchen, andererseits bei ein und demselben Versuchstier beobachtet, dem ein Muskel vor und ein zweiter in verschiedenen Intervallen nach Lockerung der Ligatur entnommen wurde.

Das Glykogen wurde mit der Anthronmethode (modifiziert nach Klicpera, Drahota u. Žák 1957), die Milchsäure kolorimetrisch mit p-Oxydiphenyl (Barker u. Summerson 1941) und die Kreatinphosphorsäure nach Alexejeva (1951) bestimmt. Die Muskeltemperatur maßen wir mit einem nadelförmigen Thermoelement aus Kupfer und Konstantan.

Zur Beurteilung motorischer Störungen nach Applikation der Ligatur diente der Zehenspreizreflex.

In einigen Fällen fixierten wir die entnommenen Muskeln in einer 10%igen Formollösung und untersuchten sie nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin auch histologisch.

Die Durchschnittswerte für die verschiedenen Metaboliten sind mit M_k auf der Kontrollseite und mit M_p auf der Versuchsseite bezeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Testes.

Ergebnisse

I. Störungen der motorischen Funktion

a) Bei 4 Ratten mit dauernd unterbundener *Aorta abdominalis* beobachteten wir 4 Tage lang die Änderungen der motorischen Funktion. Der Zehenspreizreflex blieb 30 min nach Applikation der Ligatur bei drei von den 4 Versuchstieren aus. Bei 2 Ratten trat der Reflex nach 2 Std wieder auf, bei der 3. Ratte nach 3 Tagen und war nach 4 Tagen bei allen Tieren wieder normal.

b) Nach dauernder Unterbindung der Aorta abdominalis *und* Vena cava caudalis erlosch der Zehenspreizreflex bereits nach 15 min und stellte sich während der weiteren Applikationsdauer (24 Std) nicht mehr ein.

c) Bei allen Ratten, die nach Lockerung einer einstündigen Ligatur untersucht wurden, kehrte der Zehenspreizreflex fast sofort nach dem Erwachen aus der Narkose, also ungefähr nach 10 min, wieder.

Eine einstündige Ligatur der Aorta und Vena cava führt demnach zu einer vollkommen reversiblen, vorübergehenden Störung der motorischen Funktion. Länger dauernde Ligaturen verursachen eine irreversible

Störung, die sich auch durch zunehmende Flexionskontrakturen bemerkbar macht. Die Unterbindung der Aorta allein zieht eine unbeständige Störung der motorischen Funktion nach sich, die mit der unterschiedlichen Leistungsfähigkeit des Kollateralkreislaufes zusammenhängen dürfte (Shepherd 1952).

Entstehung und Dauer der Lähmung nach Anbringung des Tourniquets wurde vor allem in der klinischen Literatur (Lewis, Pickering u. Rotschild 1931, Denny Brown u. Brenner 1944) erörtert. Auch in diesen Fällen kann sich die motorische Funktion nach Lockerung des Tourniquets außerordentlich schnell erneuern, doch ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Die schnelle Reversibilität der motorischen Strömungen in unseren Versuchen gab jedenfalls eine gute Möglichkeit, die Restitution des Stoffwechsels nach beendigter Ligatur zu beobachten.

II. Morphologische Veränderungen

Eine Stunde nach Unterbindung der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis waren in den Muskeln keine Merkmale einer Ischämie anzutreffen. Nach länger dauernder Ligatur (24 Std) war eine Dilatation der Gefäße mit örtlichen kapillaren Blutungen zu beobachten, wobei einige Muskelfasern den Verlust der Querstreifung erkennen ließen. Auch eine lang dauernde Ligatur zieht also keine ausgeprägten ischämischen Veränderungen im Muskel nach sich, wahrscheinlich deshalb, weil der Kollateralkreislauf immer noch hinreichend leistungsfähig ist.

Bei den in verschiedenen Intervallen (4 und 24 Std) nach einstündiger Ligatur entnommenen Muskelpräparaten war eine größere Gefäßdilatation in den denervierten Muskeln 24 Std nach Lockerung der Ligatur zu beobachten. Eine solche Dilatation war in den Normalmuskeln nicht zu finden.

III. Änderungen des Glykogengehalts

a) Nach Unterbindung der Aorta abdominalis. Nach *halbstündiger* Ligatur war das Sinken des Glykogengehalts statistisch nicht signifikant (Tab. 1). Bei einer anderen Tiergruppe beobachteten wir die Änderungen im Glykogengehalt 4 Std nach Aufhebung einer halbstündigen Ligatur. Der Kontrollmuskel wurde unmittelbar vor Aufhebung der Ligatur, der Versuchsmuskel 4 Std später entnommen. Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist blieb der Glykogengehalt unverändert.

Nach *einstündiger* Unterbindung der Aorta abdominalis trat eine signifikante Verminderung des Glykogengehalts ein ($P < 0{,}05$; Tab. 1). 4 Std nach beendigter Ligatur war der Glykogengehalt derselbe wie unmittelbar danach.

Ähnliche Versuche wurden an Tieren vorgenommen, bei denen 3 Tage vor dem eigentlichen Versuch beiderseits der N. ischiadicus hoch am Oberschenkel durchtrennt worden war. Im denervierten Muskel stieg der Glykogengehalt 4 Std nach Aufhebung der halbstündigen Ligatur um 23,8% (Tab. 1).

Sowohl die halbstündige als auch die einstündige Unterbindung der Aorta führte also zu verhältnismäßig unbedeutenden Veränderungen des Glykogengehalts, besonders im Normalmuskel. Der Kollateralkreislauf ist ausreichend leistungsfähig, was sich auch aus der schnellen Reversibilität der funktionellen Veränderungen ergab.

Tabelle 1. *Änderungen im Glykogengehalt des M. tibialis von Ratten bei Ligatur der Aorta abdominalis*

Eingriff	Tierzahl	Glykogen in mg-%		M_p/M_k in Prozent
		Kontrollseite M_k	Versuchsseite M_p	
Normale Ratten 30 min dauernde Ligatur	11	709	653	92,9 ± 5,6
4 Std nach Lockerung der Ligatur	9	546+	586	110,8 ± 6,8
60 min dauernde Ligatur	8	661	581	*88,2 ± 4,12
4 Std nach Lockerung der Ligatur	4	660+	575	88,7 ± 15,3
3 Tage nach Durchtrennung d. N. ischiadicus				
30 min dauernde Ligatur	5	409	424	102,5 ± 4,85
4 Std nach Lockerung der Ligatur	9	305+	371	*123,8 ± 8,12
60 min dauernde Ligatur	5	370	353	100,7 ± 15
4 Std nach Lockerung der Ligatur	4	364+	411	116,5 ± 15

Die Glykogenwerte in Milligramm-Prozent entsprechen den Durchschnittswerten der Einzelbestimmungen. M_p/M_k wurde bei jedem Tiere gesondert berechnet. Der Wert M_p/M_k in der Tabelle entspricht dem Durchschnittwert dieser Berechnungen.

Die mit * bezeichneten Werte sind statistisch signifikant. Die mit + bezeichneten Kontrollwerte drücken den Glykogengehalt unmittelbar vor Lockerung der Ligatur aus.

b) Nach Unterbindung der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis. Eine Stunde nach Applikation der Ligatur sank das Glykogen um 19%. Wurde der Muskel 2, 4 und 8 Std nach Aufhebung der einstündigen Ligatur, der Kontrollmuskel unmittelbar vor Aufhebung entnommen, so kam es im Normalmuskel zu keiner Resynthese des Glykogens. Um festzustellen, ob das Glykogen im Normalmuskel zu normalen Werten zurückkehrt, bestimmten wir das Glykogen im M. tibialis anterior von Ratten 24 Std nach Aufhebung der Ligatur. Der Glykogengehalt in den Muskeln dieser Ratten betrug $M_p = 599 \pm 14{,}3$ mg-% (8 Muskeln), $M_k = 601 \pm 17{,}2$ mg-% (10 Muskeln) wobei M_k die Glykogenwerte in den Muskeln der

Kontrollgruppe darstellt. Nach 24 Std kehrte der Glykogenspiegel zur Norm zurück.

Analoge Versuche unternahmen wir an Tieren mit 3 Tage vor dem eigentlichen Experiment bilateral durchtrenntem N.ischiadicus (Tab. 2).

Tabelle 2. *Änderungen im Glykogengehalt des M. tibialis von Ratten nach einstündiger Ligatur der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis*

Eingriff	Tierzahl	Glykogen in mg-%		M_p/M_k in Prozent	$t =$
		Kontrollseite M_k	Versuchsseite M_p		
Normale Ratten					
1 Std nach Anlegung der Ligatur	14	615	498	81,0 ± 2,9	6,56
2 Std nach Lockerung der Ligatur	5	443+	429	96,1 ± 4,24	
4 Std nach Lockerung der Ligatur	8	419+	400	95,9 ± 6,32	
8 Std nach Lockerung der Ligatur	7	293+	267	93,5 ± 01,44	
3 Tage nach Durchtrennung d. N. ischiadicus					
1 Std nach Anlegung der Ligatur	6	349	269	70,6 ± 3,98	7,4
2 Std nach Lockerung der Ligatur	7	287+	315	121 ± 22,8	
4 Std nach Lockerung der Ligatur	6	176+	408	251 ± 41,3	3,68
8 Std nach Lockerung der Ligatur	7	114+	230	221,9 ± 36,9	3,3

Die mit + bezeichneten Kontrollwerte drücken den Glykogengehalt unmittelbar vor Lockerung der Ligatur aus.

Eine Stunde nach Anlegung der Ligatur sank der Glykogengehalt ähnlich wie bei den normalen Ratten. 2, 4 und 8 Std nach Lockerung der Ligatur setzte im denervierten Muskel die Resynthese des Glykogens ein, welche die unmittelbar vor Lockerung der Ligatur festgestellten Werte ziemlich stark überstieg (Abb. 1). Um den Befund zu bestätigen, daß die Resynthese auch die Ausgangswerte des Glykogens im denervierten Muskel übersteigt, entnahmen wir bei einer weiteren Gruppe (6 Tiere) einen Muskel vor Anlegung der Ligatur, einen zweiten 4 Std nach ihrer Lockerung. Die Glykogenwerte waren $M_k = 381$ mg-%, $M_p = 413$ mg-%, $M_p/M_k = 122{,}5 \pm 9{,}0$%.

Es kam also zu einer Resynthese des Glykogens, die signifikant die Ausgangswerte übertraf ($P < 0{,}05$). Eine gegenüber dem Normalmuskel erhöhte Resynthese des Glykogens 4 Std nach Lockerung der Ligatur zeigte auch ein Versuch, in dem der N. ischiadicus 3 Tage vorher auf der einen Seite durchtrennt wurde, und die Muskeln 4 Std nach Lockerung der Ligatur entnommen wurden. Bei der Kontrollgruppe (5 Tiere) war das Verhältnis des Glykogengehalts im denervierten und im normalen Muskel $70{,}2 \pm 4{,}79\%$; bei der Versuchsgruppe nach Ligatur (4 Tiere) stieg dieses Verhältnis auf $90{,}0 + 3{,}28\%$. Dieser Anstieg war hoch signifikant ($P < 0{,}01$).

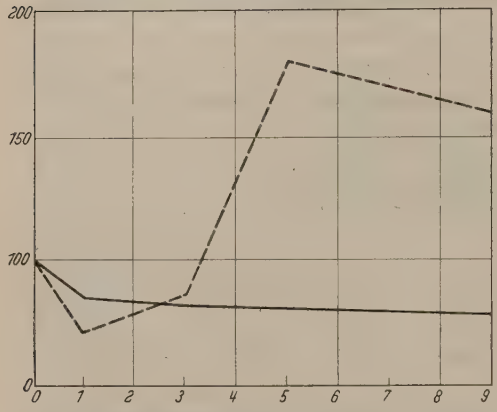


Abb. 1. Veränderungen im Glykogengehalt des normalen —— und des denervierten Muskels ---- bei Unterbindung der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis. Auf der Abszisse: Zeit in Stunden, auf der Ordinate: Prozent. Die Glykogenwerte bezogen auf den Glykogengehalt vor der Ligatur (100%). 1 (Abszisse) zeigt die Lockerung der Ligatur an

Wir können also schließen, daß das Glykogen im denervierten Muskel gegenüber dem Normalmuskel nach vorübergehender Ischämie in gesteigertem Maße resynthetisiert wird. Es ergeben sich folgende Fragen:

1. Warum ist die Resynthese im Normalmuskel herabgesetzt?
2. Warum ist die Resynthese im denervierten Muskel erhöht?

1. Verminderung der Glykogenresynthese im Normalmuskel. Die Unterbindung der Aorta und Vene könnte ähnlich wie das Tourniquet zu schockähnlichen Zuständen führen, die eine ernste Störung des Energieumsatzes hervorrufen.

Green u. Stoner (1954) geben als Ursache dieser Störung den Verlust energetisch reicher Verbindungen (siehe auch Bollmann u. Flock 1944, Green u. Stoner 1950, Festisova 1954 u. a.), die Abnahme oxydativer Phosphorylierungen und schließlich den unvollständigen Zerfall der Kohlenhydrate an, der sich ähnlich wie in der Anaerobiose, durch Zunahme der Milchsäure und Abnahme der Benztraubensäure geltend macht.

Die Abnahme der Kreatinphosphorsäure stellten wir in unseren Versuchen unmittelbar vor Lockerung der Ligatur fest, 4 Std später überstieg der Kreatinphosphorsäuregehalt signifikant die Ausgangswerte ($P < 0{,}02$; Tab. 3). Ebenso kehrten die 1 Std nach Lockerung der Ligatur erhöhten Milchsäurewerte binnen 4 Std zu den Ausgangswerten zurück (Tab. 4).

Es kann also geschlossen werden, daß in unseren Versuchen weder eine dauernd gestörte Resynthese der energiereichen Verbindungen, noch ein unzureichender aerober Abbau der Kohlenhydrate eintrat, der sich in einer Ansammlung von Milchsäure ausgewirkt hätte. Dem Schock kam also keine entscheidende Bedeutung zu. Dafür sprechen auch die Glykogenwerte nach dem quasioperativen Eingriff (einstündige Exposition

Tabelle 3. *Kreatinphosphorsäuregehalt in Muskeln nach Ligatur der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis*

Eingriff	Kreatinphosphorsäure in mg-%			
	Kontrollmuskeln	Zahl	Vers. Muskeln	Zahl
Normalmuskeln				
1 Std nach Anlegung der Ligatur	421 ± 16,5	(20)	246 ± 18,3	(14)
4 Std nach Lockerung der Ligatur			467 ± 9,2	(12)
3 Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus				
1 Std nach Anlegung der Ligatur	374 ± 22,1	(20)	88,5 ± 16	(14)
4 Std nach Lockerung der Ligatur			360 ± 25,1	(12)

Tabelle 4. *Milchsäuregehalt bei Ligatur der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis*

Eingriff	Milchsäure in mg-%			
	Kontrollmuskeln	Zahl	Vers. Muskeln	Zahl
Normalmuskeln				
1 Std nach Anlegung der Ligatur	51,7 ± 5,2	(20)	81,5 ± 8,3	(12)
4 Std nach Lockerung der Ligatur			43,6 ± 3,6	(11)
3 Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus				
1 Std nach Anlegung der Ligatur	61,3 ± 3 ,6	(20)	133,6 ± 13,9	(12)
4 Std nach Lockerung der Ligatur			57,9 ± 7.9	(11)

der Eingeweide und Manipulationen an den Gefäßen), der einen Schock auslösen könnte.

Ausgangswerte (11 Tiere) 513 + 26,4 mg-%. Am Ende der einstündigen Exposition (5 Tiere) 604 ± 11,9 mg-%. 4 Std nach der Sutur der Bauchwand (5 Tiere) 450 ± 22,6 mg-%.

Gegen den Schock als entscheidenden Faktor spricht auch das Fehlen klinischer Schocksymptome und der gleiche Vitamin C-Spiegel in den Nebennieren 4 Std nach Lockerung der Ligatur (484 mg-%) wie bei den Kontrolltieren (505 mg-%).

Die Störung der Resynthese könnte ferner auch durch Gefäßspasmen bedingt sein, die durch die Ligatur infolge Reizung der die Gefäße begleitenden sympathischen Nervenfasern hervorgerufen werden. Green u. Stoner (1950) geben an, daß

nach Anlegung des Tourniquets ähnliche Veränderungen auch bei der kontralateralen Extremität, sogar ziemlich weit von der Applikationsstelle entfernt, zu beobachten sind (siehe auch de Suoville 1956). Dieser Faktor scheint jedoch in unseren Versuchen nicht von entscheidender Bedeutung gewesen zu sein, da wir nach alleiniger Ligatur der Aorta keine Störung der Glykogenresynthese beobachten konnten. Auch in Versuchen mit 6 Tage vorher durchgeführter Sympathektomie fanden wir keine Unterschiede im Vergleich zu Versuchen mit Tieren, deren Sympathicus intakt war. In dieser Versuchsserie (5 Tiere) wurde ein Muskel unmittelbar vor Lockerung der Ligatur, der zweite 4 Std später entnommen. Der Glykogengehalt betrug

$$M_k = 508 \text{ mg-}\%, M_p = 487 \text{ mg-}\%, M_p/M_k = 97{,}1 \pm 8\% .$$

Die Sympathektomie, die wahrscheinlich spasmenverhindernd wirken sollte (Donhorst u. Sharpey Schafer 1951), trug also nicht zur Erhöhung der Glykogenresynthese bei. Dem entspricht auch das Ergebnis unserer Versuche mit Temperaturmessungen des Muskels während der Ligatur und 4 Std nach ihrer Lockerung. Die rectale Temperatur ändert sich, analog der Muskeltemperatur (Abb. 2).

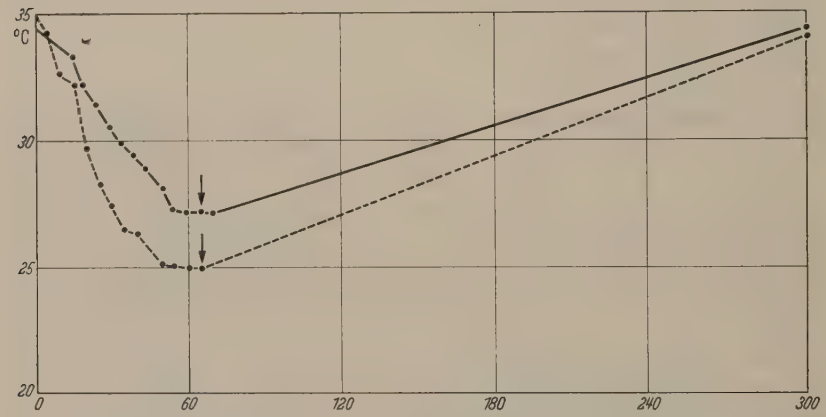


Abb. 2. Die Temperatur im Muskel —— und im Rectum ---- bei Unterbindung der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis. Auf der Abszisse Zeit in Minuten, auf der Ordinate ° C. Der Pfeil zeigt die Lockerung der Ligatur

Es ist also anzunehmen, daß die verminderte Glykogenresynthese weder durch eine Umsatzstörung als Begleiterscheinung des Schocks, noch durch Spasmen bewirkt wurde, die bei Applikation der Ligatur eintreten können. Möglicherweise ist infolge der Ligatur der Eiweißabbau unter dem Einfluß der aus der Nebenniere ausgeschwemmten Hormone oder unmittelbar der Ischämie (siehe Cuthberson 1954) gesteigert, und die Glykogenresynthese deshalb gestört, weil die Energie zur Erneuerung der Eiweißstrukturen verwendet wird. Für diese Annahme würde auch der Befund eines signifikanten Eiweißzerfalls in den Muskeln nach Applikation des Tourniquets (Green u. Stoner 1950) sprechen.

2. Erhöhung der Glykogenresynthese nach vorübergehender Ischämie im denervierten Muskel. Es wäre möglich, daß es im denervierten Muskel während der Ischämie nicht zum Abbau der Kreatinphosphorsäure

kommt und daß daher die in der Restitutionsperiode durch den Glykogenzerfall freiwerdende Energie nicht zur Resynthese der Kreatinphosphorsäure ausgenützt wird. In unseren Versuchen stellten wir jedoch im denervierten Muskel eine Stunde nach Anlegung der Ligatur eine stärkere Abnahme der Kreatinphosphorsäure fest als im Normalmuskel. 4 Std nach Lockerung der Ligatur war der Kreatinphosphorsäuregehalt bereits völlig restituiert (Tab. 3 und Abb. 3). Im denervierten Muskel (3 Tage nach Nervendurchtrennung) ist also die Resynthese der Kreatinphosphorsäure nicht gestört, obzwar während der Ischämie der Kreatinphosphorsäurezerfall im Vergleich zum Normalmuskel erhöht ist.

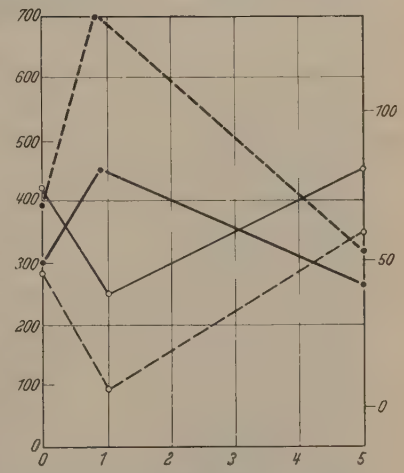


Abb. 3. Kreatinphosphorsäure ---- und Milchsäure ---- in Milligramm-Prozent im normalen (ausgezogene Linie) und im denervierten Muskel (gestrichelte Linie) bei Unterbindung der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis. Auf der Abszisse Zeit in Stunden, auf der Ordinate links Kreatinphosphorsäure in Milligramm-Prozent, rechts Milchsäure in Milligramm-Prozent. 1 (Abszisse) zeigt die Lockerung der Ligatur

Während der Ischämie ist begreiflicherweise der anaerobe Metabolismus akzentuiert, was sich in einer stärkeren Konzentration der Milchsäure im Muskel bemerkbar macht. Milchsäure kann unmittelbar zur Glykogensynthese im Herzmuskel und im Froschmuskel beitragen (siehe Wilhelmi 1955), in geringerem Ausmaße sogar im normalen Skeletmuskel (Omachi u. Lifson 1956). Dieser Anteil des Laktats an der Glykogenresynthese erhöht sich möglicherweise im denervierten Muskel (Sato u. Kasugai 1953), was auch den Vorstellungen Orbelis von der Rückkehr des denervierten Muskels auf eine niedrigere phylogenetische Stufe entsprechen würde (Orbeli 1945).

Der Milchsäuregehalt steigt im denervierten Muskel während der Ischämie bedeutend stärker als im normalen Muskel (Tab. 4 und Abb. 3). Diese Tatsache und ebenso die schnelle Rückkehr des Milchsäuregehalts zu den Ausgangswerten weisen darauf hin, daß sich die Milchsäure im denervierten Muskel wirklich in größerem Maße an der Glykogensynthese beteiligen kann als im Normalmuskel.

Diese Vermutung sollte ihre Bestätigung in Versuchen finden, in denen wir den Muskel vor Applikation der Ligatur reizten, also einen Eingriff vornahmen, der gleichfalls den Milchsäuregehalt steigert. Der M. tibialis anterior der einen Seite wurde direkt durch galvanischen Strom mittels Elektroden gereizt, die auf die Haut oberhalb des Muskels gelegt waren (Frequenz 120 min, 20 V, Gesamtzahl der Impulse 450). Nach beendigter Reizung wurde sofort die Aorta abdominalis auf 30 min unterbunden und 2 und 4 Std nach Lockerung der Ligatur bilateral der M. tibialis anterior entnommen. Der gereizte Muskel war immer der

Versuchsmuskel (M_p). Die Ergebnisse bringt Tab. 5. Wurde der denervierte Muskel ohne Applikation der Ligatur gereizt, so kehrte der Glykogengehalt auch 4 Std nach der Reizung nicht zu seinen Ausgangswerten zurück. Wurde aber nach der Reizung die Aorta abdominalis unterbunden, so kam es im denervierten Muskel zu einer gesteigerten Glykogenresynthese, die nach

Tabelle 5. *Glykogengehalt im M. tibialis von Ratten nach direkter elektrischer Reizung und Ligatur der Aorta abdominalis*

Eingriff	Tierzahl	Glykogen in mg-%		M_p/M_k in Prozent
		Kontroll-muskel/M_k	Vers. Muskel/M_p	
Normalmuskeln				
Sofort nach Reizung*	4	401	77	20 ± 2,0
2 Std nach Reizung*	4			122 ± 11,8
4 Std nach Reizung*	4			125 ± 5,1
2 Std nach Reizung u. Ligatur	8	648	701	111,2 ± 7,8
4 Std nach Reizung u. Ligatur	8	574	488	83,3 ± 3,0
3 Tage nach Durchtrennung des N. ischiadicus				
Sofort nach Reizung*	4	223	39	18 ± 1,4
2 Std nach Reizung*	8			82,0 ± 5,1
4 Std nach Reizung*	4			80,0 ± 8,2
2 Std nach Reizung u. Ligatur	8	353	338	96,9 ± 5,9
4 Std nach Reizung u. Ligatur	8	447	496	113,3 ± 6,48

Die mit * bezeichneten Werte sind der Arbeit von Bass, Gutmann u. Vodicka (1955) entnommen.

4 Std die ursprünglichen Werte überstieg. Es ist anzunehmen, daß die vorhergehende Reizung des Muskels die Milchsäuremenge erhöht (Levine, Hechter u. Soskin 1941). Ferner ist möglich, daß die Glykogenresynthese in diesen Versuchen infolge Ausnützung des Laktats gesteigert war. Im Normalmuskel blieb die vorangegangene Reizung ohne Einfluß auf die Glykogenresynthese nach Ligatur (Tab. 5). 2 und 4 Std nach Reizung überstieg im normalen Muskel das Glykogen die Ausgangswerte. Wurde aber sofort nach Muskelreizung die Aorta auf 30 min unterbunden, so kam es nicht zu dieser Erhöhung. Die unterschiedliche Reaktion des normalen und des denervierten Muskels auf Ischämie nach vorangegangener Reizung zeigt Abb. 4.

Es ist also möglich, daß die gesteigerte Glykogenresynthese im denervierten Muskel nach Ischämie teilweise durch eine erhöhte Utilisierung der Milchsäure bewirkt war.

Diskussion

Unsere Arbeit zeigt, daß der denervierte Muskel auf vorübergehende Ischämie anders reagiert als der Normalmuskel, in dem wir in Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur ein Absinken des Kreatinphosphorsäure- und Glykogenspiegels und eine Zunahme der Milchsäure während der Ischämie feststellten (Bollmann u. Flock 1944, McPherlane u. Spooner 1946, Wiggers 1950, Fetisova 1954). Nach einstündiger Ischämisierung kehren Kreatinphosphorsäure und Milchsäure binnen 4 Std zu ihren Ausgangswerten zurück, während der Glykogengehalt in der selben Zeit nicht die Norm erreicht.

Im denervierten Muskel kommt es dagegen zu einer gesteigerten Kreatinphosphorabnahme und zu einer größeren Produktion von Milchsäure, nicht aber zu einer Störung der Glykogenresynthese wie im Normalmuskel.

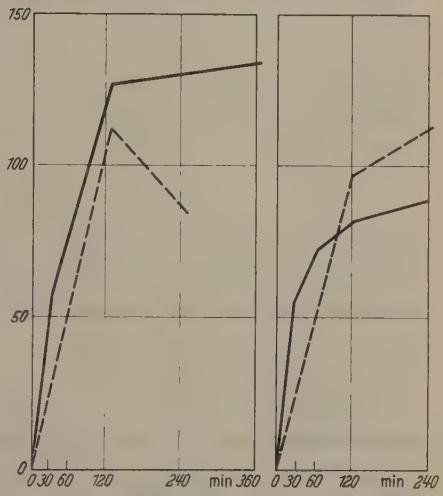


Abb. 4. Glykogenresynthese im normalen (linke Hälfte des Diagramms) und im denervierten Muskel (rechte Hälfte des Diagramms) nach direkter Muskelreizung —— nach direkter Muskelreizung und Ligatur der Aorta ----. Auf der Abszisse Zeit in Minuten, auf der Ordinate Glykogen in Prozent. 100% = Glykogenspiegel im nicht gereizten Kontrollmuskel. Der Nullwert drückt den Glykogengehalt sofort nach der Muskelreizung aus

Die gestörte Glykogenresynthese im Normalmuskel nach Lockerung der Ligatur ließe sich vielleicht als Folgeerscheinung des Schocks erklären. Unsere Kontrollversuche zeigten aber nicht, daß in diesem Falle der Schock der entscheidende Faktor war. — Es wurde weiter vorausgesetzt, daß der Stoffwechsel während eines Schocks vor allem durch eine Verschiebung gegen die Anaerobiose hin charakterisiert sei und daß die Veränderungen des Stoffwechsels im Schock und bei Anoxie parallel verlaufen (Engel, Winton, Long, 1943, Engel 1945). In unseren Versuchen hatte sich dagegen gezeigt, daß im denervierten Muskel trotz akzentuierter Anaerobiose bei Ischämie die Glykogenresynthese gesteigert war.

Eine weitere mögliche Interpretation der ungenügenden Glykogenresynthese nach Ischämie im *Normal*muskel wäre die verminderte Blutströmung nach Lockerung der Ligatur. Ernste ischämische Veränderungen im Muskel wurden oft mit arteriellen Spasmen erklärt (Leriche 1935, Cohen 1948), so vor allem die bei der sogenannten Volkmannschen Parese festgestellten schweren ischämischen Läsionen (siehe Bowden u. Gutmann 1949). Die schnelle Reversibilität der beobachteten motorischen Störungen und das Fehlen ernsterer morphologischer Veränderungen nach Ligatur der Aorta und Vene sprechen aber gegen die Existenz eines Spasmus sowohl im normalen als auch im denervierten Muskel

ebenso wie die Versuche mit Sympathektomie und Temperaturmessungen. Trotzdem ist nicht unbedingt die Möglichkeit auszuschließen, daß die Störung des Kohlenhydratstoffwechsels im Normalmuskel bis zu einem gewissen Grade durch die verminderte Blutströmung als mögliche Folge der Ligatur verursacht sein kann. Eine solche Verminderung der Blutströmung beschreiben — allerdings nach einer bedeutend länger dauernden Ischämie — Lambert, Neveu u. Stevens (1951), Kinmonth, Simeone u. Perlow (1949), Issekutz, Hetényi u. Winter (1955), de Suoville (1956). In unseren Versuchen haben wir die Blutströmung nicht gemessen. Für die Störung der Glykogenresynthese nach Ischämie im Normalmuskel können wir vorläufig keine befriedigende Erklärung geben; möglicherweise wird die Energie zur Resynthese anderer während der Ischämie abgebauter Verbindungen verwendet, nicht nur der Kreatinphosphorsäure, sondern auch der Eiweiße (Green u. Stoner 1950).

Es ist unwahrscheinlich, daß für die erhöhte Glykogenresynthese im denervierten Muskel die Steigerung der Blutströmung ein wichtiger Faktor ist (Seeling, Lyon 1909). Dies käme einer erhöhten Zufuhr von Glukose und Sauerstoff gleich, die aber der denervierte Muskel unter normalen Bedingungen nicht auszunützen fähig ist, zumal so bald nach seiner Denervation (Gutmann, Vodička, Vrbová 1954, Hudlická, Vrbová 1958).

Die Möglichkeit einer direkten Ausnützung der Milchsäure zur Glykogenresynthese im denervierten Muskel haben wir bereits früher erörtert. Es müßte nachgewiesen werden, ob im denervierten Muskel wirklich eine Verschiebung des Stoffwechsels gegen die Anaerobiose hin in dem Sinne erfolgt, daß die Utilisierung einiger Metaboliten relativ gesteigert ist. Es ist somit unwahrscheinlich, daß die primären Ursachen der metabolischen Störungen im denervierten Muskel vasomotorischer Art sind. Weitaus wahrscheinlicher handelt es sich um eine Störung in der Utisilierung oder Zufuhr von Wirkstoffen.

Eine weitere Möglichkeit schließlich besteht darin, daß der Sauerstoffmangel im innervierten Muskel durch Erregung der Muskelspindeln eine reflektorische Dauererregung der motorischen Endplatten erzeugt, während dies im denervierten Muskel nicht der Fall ist. Es wäre demnach vorstellbar, daß der erhöhte Aktivitätszustand des normalen Muskels die Ursache dafür ist, daß die Resynthese von Glykogen langsamer erfolgt als im denervierten Muskel, bei welchen diese reflektorisch ausgelöste Hyperaktivität nicht in Frage kommt.

Zusammenfassung

Wir untersuchten die Veränderungen im Glykogen-, Milchsäure- und Kreatinphosphorsäuregehalt des normalen und denervierten M. tibialis anterior von Ratten nach Ligatur der Aorta abdominalis und Vena cava caudalis.

1. Eine Stunde nach Anbringung der Ligatur, während der es zu einem vorübergehenden Verlust der motorischen Funktion (Zehenspreizreflex) kam, sank der Glykogen- und Kreatinphosphorsäuregehalt. Im normalen Muskel kam es im Verlauf von 8 Std nach Lockerung der Ligatur zu keiner Resynthese des Glykogens, während im denervierten Muskel der Glykogegngehalt bereits nach 4 Std die Ausgangswerte überstieg. Der Kreatinphosphorsäuregehalt kehrte im normalen und im denervierten Muskel 4 Std nach Lockerung der Ligatur zur Norm zurück.

2. Der Milchsäuregehalt stieg während der Ischämie im denervierten Muskel mehr an als im normalen und erreichte in beiden Fällen 4 Std nach Lockerung der Ligatur die Norm.

3. Es wird die Möglichkeit einer direkten Ausnützung der Milchsäure zur Glykogenbildung im denervierten Muskel bei Sauerstoffmangel erörtert.

Literatur

Alexejeva, A. M.: K voprosu o prevraščeniji kreatinfosfata v kreatinin i o novom metodě opredelenija kreatinfosfata. Biochimija **16**, 97 (1951).

Anrep, G. V., and E. Saalfeld: The blood flow through the skeletal muscle in relation to its contraction. J. Physiol. **85**, 375 (1935).

Barker, S. B., and B. H. Summerson: The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. biol. Chem. **138**, 535 (1941).

Bass, A., E. Gutmann and Z. Vodička: The resynthesis of glycogen in muscle after stimulation. Physiol. Bohemoslov. **4**, 267 (1955).

Bollmann, J. L., and E. V. Flock: Changes in phosphate of muscle during tourniquet shock. Amer. J. Physiol **142**, 290 (1944).

Bowden, R., and E. Gutmann: The fate of voluntary muscle after vascular injury in man. J. of Bone and Joint Surgery **31** B, 356 (1949).

Cohen, S. M.: Accidental intra arterial injection of drugs Lancet **2**, 361, 409 (1948).

Cuthberson, D. P.: Interrelationship of metabolic changes consequent to injury. Brit. med. Bull. **10**, 33 (1954).

Denny-Brown, D., and Ch. Brenner: Paralysis of nerve induced by direct pressure and by tourniquet. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **51**, 1 (1944).

Donhorst, A. C., and E. D. Sharpey Schafer: Collateral resistance in limbs with arterial obstruction: spontaneous charges and effects of sympathectomy. Clin. Sci. **10**, 371 (1951).

Doupe, J., R. Barnes and A. S. Kerr: Studies in denervation on the circulation and recovery of denervated muscle. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. **6**, 136 (1943).

Engel, F. L.: J. Mt. Sinai Hosp. **12**, 152 (1945) (viz H. N. Green, a H. B. Stoner 1954).

Engel, F. L., M. G. Winton and Long: J. exp. Med. **77**, 397 (1943).

Fetisova, T. B.: Obměn věščestv v myšach pri naloženiji i sňatiji krovoostanavlivajuščevo žguta. Voprosy biochimiji myšč, Kijev 1954.

Fox, C. L., and H. Baer: Redistribution of potassium, sodium and water in burns and trauma, and its relation to the phenomena of shock. Amer. J. Physiol. **151**, 155 (1947).

Fuhrman, F. A., and J. M. Crismon: Muscle electrolytes in rats following ischemia produced by tourniquets. Amer. J. Physiol. **167**, 289 (1951).

Gaskell, W. H.: The changes in blood stream in muscles through stimulation of their nerves. J. Anat. (Lond.) **11**, 360 (1877).

Green, H. N., and H. B. Stoner: Muscle ischaemia and the reaction to injury with special reference to the role of nucleotids. Le muscle, Compte-rendu du Colloque tenu à Royaumont 1950.

Green, H. N., and H. B. Stoner: Effects of injury on carbohydrate metabolism and energy transformation. Brit. med. Bull. **10**, 38 (1954).

Gutmann, E., Z. Vodička und G. Vrbová: Nervöse Leitung der Superkompensation. Physiol. Bohemoslov. **3**, 182 (1954).

Harman, J. W., and R. P. Gwin: The recovery of skeletal muscle fibres from acute ischaemia as determined by histological and chemical methods. Amer. J. Path. **25**, 741 (1949).

Hudlická, O., and G. Vrbová: Changes in the bloodflow and oxygen consumption of the hind limb in dogs after section of the sciatic nerve. Physiol. Bohemoslov. **7**, 38 (1958).

Issekutz, R., G. Hetényi and M. Winter: Muskelstoffwechsel im Tourniquetschock. Acta physiol. Acad. Sci. hung. **7**, 361 (1955).

Keller, M. J., A. Loeser and H. Rein: Die Physiologie der Skeletmuskeldurchblutung. Z. Biol. **90**, 260 (1930).

Kinmonth, J. B., F. A. Simeone and V. Perlow: Factors affecting the diameter of large arteries with particular reference to traumatic spasm. Surgery **26**, 452 (1949).

Klicpera, M., Z. Drahota und R. Žák: Zametki k opredeleniju glikogena v myšce. Physiol. Bohemoslov. **6**, 569 (1957).

Lambert, J., C. Neveu et A. Stevens: Réactions vasculaires différentes dans le peau et le muscle chez le chien après interruptions momentanées de la circulation artérielle. Arch. int. Physiol. **59**, 451 (1951).

Langley, J. N., and M. Igataki: The oxygen use of denervated muscle. J. Physiol. **51**, 202 (1917).

Leriche, R.: Bulletins et Mémoires de la Société National de Chirurgie **61**, 295 (1935).

Levine, R., O. Hechter and S. Soskin: Biochemical characteristics of denervated skeletal muscle at rest and after direct stimulation. Amer. J. Physiol. **132**, 336 (1941).

Lewis, T., G. W. Pickering and P. Rotschild: Centripetal paralysis arising out of arrested bloodflow to the limb including notes on a form of tingling. Heart **16**, 1 (1931).

McPhee, I.: Cellular cation changes in rat muscle following ischaemic anoxia and trauma. Clin. Sci. **14**, 451 (1955).

McPherlane, M. G., and S. J. L. Spooner: Chemical changes in muscle during and after ischaemia. Brit. J. exp. Path. **27**, 339 (1946).

Omachi, A., and N. Lifson: Metabolism of isotopic lactate by the isolated perfused dog gastrocnemius. Amer. J. Physiol. **185**, 35 (1956).

Orbeli, L. A.: Evoljucija nervno-myščegnovo pribora. Trudy fiz. inst. I. P. Pavlova **1**, 3 (1945).

Sato, T., und S. Kasugai: Über den Kohlenhydrat- und Energieumsatz im atrophischen Muskel. Tohoku J. exp. Med. **26**, 336 (1935).

Schapira, G., et J. C. Dreyfus: Les syndromes biochimiques musculaires. Le Muscle, Compte-rendu du Colloque tenu à Royaumont 1950.

Seeling, M. G., and E. D. Lyon: The condition of the peripheral blood vessels in shock. JAMA **52**, 45 (1909).

Shepherd, J. T.: The blood flow through the calf of the leg during acute occlusion of the femoral artery and vein. Circulation **6**, 281 (1952).

Suoville, A. de: Angiographie aorto-fémorale comparée du chien normal et garroté. Arch. int. Physiol. Biochim. **64**, 213 (1956).

Stainsby, W. N., J. T. Fales and Jr. J. L. Lilienthal: Effect of stretch on oxygen consumption of dog skeletal muscle in situ. Bull. Johns Hoph. Hosp. **99**, 249 (1956).

Wiggers, C. J.: Physiology of shock. New York, 1950, S. 348.

Wilhelmi, A. E.: Energy transformations in muscle. Fulton, Textbook of Physiology, Philadelphia, 1955.

Zubenko, P. M.: K biochimiji denervirovanych myšc. Voprosy biochimiji myšc, Kijev 1954.

Dr. O. Hudlicka, Physiologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha. — Dejoice, Na cvičišti č. 2

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 516—529 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald

Versuche zur pharmakologischen Charakterisierung des Hirudins

Von
FRITZ MARKWARDT

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Juli 1958)

Der blutgerinnungshemmende Wirkstoff Hirudin ist in vorangegangenen Arbeiten [MARKWARDT (1,2)] aus medizinischen Blutegeln isoliert und analysiert worden. Es handelt sich um ein hochmolekulares Polypeptid, dessen Wirkung auf seiner spezifischen Reaktion mit dem Gerinnungsferment Thrombin beruht. Die Untersuchung des Mechanismus dieser Reaktion (MARKWARDT u. WALSMANN) hat gezeigt, daß sich das Hirudin mit dem Thrombin durch heteropolare Valenzbindung zwischen polaren Gruppen der beiden Moleküle zu einem Assoziationskomplex vereinigt, wodurch die aktive Oberfläche des Thrombins blokkiert wird und die Fermentwirkung erlischt.

Die vorliegende Untersuchung bemüht sich um eine pharmakologische Charakterisierung des Stoffes und versucht zu klären, welche Möglichkeiten sich durch den Einsatz des spezifischen Thrombinhemmstoffes Hirudin für eine pharmakologische Beeinflussung der Blutgerinnung ergeben.

Nachdem HAYCRAFT 1886 im Schmiedebergschen Institut gezeigt hatte, daß der med. Blutegel eine blutgerinnungshemmende Substanz besitzt, war diese bis zur Entdeckung des Heparins das einzige bekannte Mittel, welches in relativ geringer Menge die Gerinnung verhindert, ohne die sonstige Beschaffenheit und Zusammensetzung des Blutes zu ändern. Entsprechend der praktischen Bedeutung, die ein solcher Stoff für die Therapie haben kann, sind frühzeitig Bemühungen erkennbar, die antikoagulierende Wirkung des Hirudins auch in Tierversuchen zu prüfen. Die Untersuchungen beschränken sich aber in der Hauptsache auf den allgemeinen Nachweis, daß durch Injektion von Blutegelpräparaten die Blutgerinnung auch in vivo beeinflußt werden kann. Als Kriterium für die Hirudinwirkung dienten dabei die Verzögerung der Spontangerinnung entnommenen Blutes (KAPOSI, BODONG, EMILE-WEIL u. BOYE, JOSSERAND u. JEANNIN, LOEFFLER, DUCING u. Mitarb., NANDRIS-CALUGAREANU), die Verlängerung der Blutungszeit (JÜRGENS) und die Verhinderung einer durch Einführung eines Fremdkörpers in die Vene ausgelösten Thrombenbildung (SAHLI, RIEMANN u. WOLF). Für die Versuche wurde entweder einfach sogenanntes Hirudinplasma benutzt, welches aus dem von Blutegeln gesogenen Blut gewonnen war, oder es kamen wäßrige Extrakte aus Blutegelköpfen und daraus bereitete Trockenpräparate zur Anwendung.

Die Beurteilung der bei diesen Arbeiten erhaltenen Ergebnisse wird von vornherein dadurch erschwert, daß die angewandten Präparate von sehr unterschiedlicher Wirkungsstärke waren und alle nur wenig Wirkstoff enthalten haben können. Es bleibt dabei auch die Frage offen, inwieweit die früher beobachteten toxischen Nebenwirkungen (Kohan, Sievert, Marshall, siehe auch Sollmann) auf die zweifellos in großer Menge verabfolgten Ballaststoffe zurückzuführen sind, die in der Hauptsache aus Eiweißkörpern und deren Zersetzungsprodukten bestehen. Ferner können durch die Injektion dieser Stoffe auch unspezifische Veränderungen der Gerinnungstendenz des Blutes hervorgerufen werden, welche eine spezifische antikoagulierende Wirkung vortäuschen.

Materialien und Methodik

Hirudin mit einer Aktivität von 8500 AT-E/mg wurde aus medizinischen Blutegeln gewonnen [Markwardt (1)]. Als gereinigtes Thrombin wurden Thrombin AWD (Arzneimittelwerke Dresden, Aktivität = 100 NIH-E/mg) und Topostasin-Roche (Hoffmann La' Roche, Grenzach-Baden, Aktivität = 60 NIH-E/mg) benutzt. Thrombokinaselösungen wurden aus Thrombokinase — Behringwerke (getrocknetes Kaninchenhirn), Fibrinogenlösungen aus Fibrinogen-Behring hergestellt.

Tierversuche wurden an 2,0—2,5 kg schweren Kaninchen durchgeführt. Für gerinnungsphysiologische Versuche in vitro wurde Kaninchenblut oder daraus bereitete Fraktionen verwandt.

Hirudin wurde nach der in einer vorangegangenen Arbeit ausführlich beschriebenen Methode [Markwardt (2)] durch Titration mit standardisiertem Thrombin bestimmt und seine Wirksamkeit in AT-E (Anti-Thrombin-Einheiten) angegeben. Zur Bestimmung des Hirudins in Harnproben wurden 0,1 ml der nötigenfalls mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf einen Gehalt von 10—200 AT-E/ml verdünnten Probe mit 0,2 ml 0,5%iger Fibrinogenlösung versetzt und die Hirudinmenge durch stufenweise Zugabe einer standardisierten Thrombinlösung bis zur Gerinnung ermittelt. Zur Hirudinbestimmung im Blut wurde Citratblut (9 Teile Blut + 1 Teil 3,8%iges Natriumcitrat) entnommen und je 0,2 ml zur Neutralisation des Hirudins mit Thrombinlösung bis zur Gerinnung der Probe versetzt. Um den Hirudingehalt im Plasma zu bestimmen, wurden die Erythrocyten aus dem Citratblut abzentrifugiert und 0,2 ml des gewonnenen Citratplasmas zur Bestimmung benutzt.

Um die Gerinnungszeit des entnommenen Citratblutes nach Recalcificieren und Thrombokinasezusatz zu bestimmen, wurden je 0,2 ml der Blutprobe im Thermostaten bei 37° C mit 0,2 ml m/40 $CaCl_2$-Lösung und 0,1 ml Thrombokinaselösung versetzt.

Versuchsergebnisse

Der Einfluß des Hirudins auf die autokatalytische Wirkung des Thrombins

Es ist seit langem bekannt, daß das Thrombin einen katalysierenden Einfluß auf seine eigene Entstehung ausübt. Nach neueren Anschauungen über den Ablauf der Blutgerinnung (Übersichten bei Seegers, Deutsch, Marbet u. Winterstein) ist dies dadurch bedingt, daß geringe Mengen des Fermentes den Zerfall der Thrombocyten fördern und die Aktivierung des Proaccelerins (Faktor V) zum Accelerin (Faktor VI) bewirken. Auf diese Weise kommt die Bildung der Plasmathrombokinase in Gang und das Accelerin entfaltet seine reaktionsbeschleunigende Aktivität. Es wurde daher in besonderen Versuchsanordnungen geprüft, ob das

Thrombin durch seine Bindung an das Hirudin auch die genannten Wirkungen auf die Thrombocyten und den Faktor V verliert.

Der Einfluß des Hirudins auf die durch Thrombin ausgelöste Thrombocytenagglutination. In einigen experimentellen Untersuchungen (Fonio, Zatti, Stefanini, Bounameaux, Robertis u. Mitarb.) konnte gezeigt werden, daß Thrombin die Agglutination und den Zerfall der Blutplättchen bewirkt. Allerdings erfolgt keine Agglutination, wenn gereinigtes Thrombin auf gewaschene Thrombocyten einwirkt. Eine deutliche Agglutination trat auch in unseren Versuchen nur in Gegenwart von Plasma ein, so daß angenommen werden muß, daß die Agglutination nicht durch Thrombin allein, sondern nur im Zusammenwirken mit anderen Plasmafaktoren ausgelöst werden kann. Damit die Agglutination aber unabhängig von der Fibrinbildung verfolgt werden konnte, wurden die Thrombocyten in defibriniertem Citratplasma suspendiert. Um den Einfluß benetzbarer Oberflächen auszuschalten, wurden sämtliche mit Thrombocyten in Berührung kommenden Geräte (Injektionsspritzen und Nadeln, Zentrifugengläser, Pipetten, Objektträger und Deckgläschen) silikonisiert.

Herstellung der Thrombocytensuspension. 10,0 ml frisch entnommenes Kaninchen — Citratblut (9 Teile Blut + 1 Teil 3,8%ige Na-citrat-Lösung) wurden zur Abtrennung der Erythrocyten und Leukocyten 5 min bei 250 g zentrifugiert. Die Blutplättchen blieben im überstehenden Plasma suspendiert und wurden durch anschließendes 10 min langes Zentrifugieren des abgeheberten Plasmas (4,0 ml) bei 700 g sedimentiert. Das Thrombocytensediment wurde 2 mal mit 2,0 ml 0,9%iger NaCl-Lösung auf der Zentrifuge gewaschen und sodann in 1,0 ml des inzwischen hitzedefibrinierten Plasmas (3 min auf 56° C erwärmt, dann zentrifugiert) resuspendiert. Zur Bestimmung der Thrombocytenzahl wurde eine Probe mit 0,9% NaCl-Lösung 1 : 10 verdünnt und in der Zeiß-Thomaschen Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Danach wurde die Suspension durch Zugabe von weiteren Mengen defibriniertem Citratplasma auf 1000000 Thrombocyten/ml eingestellt.

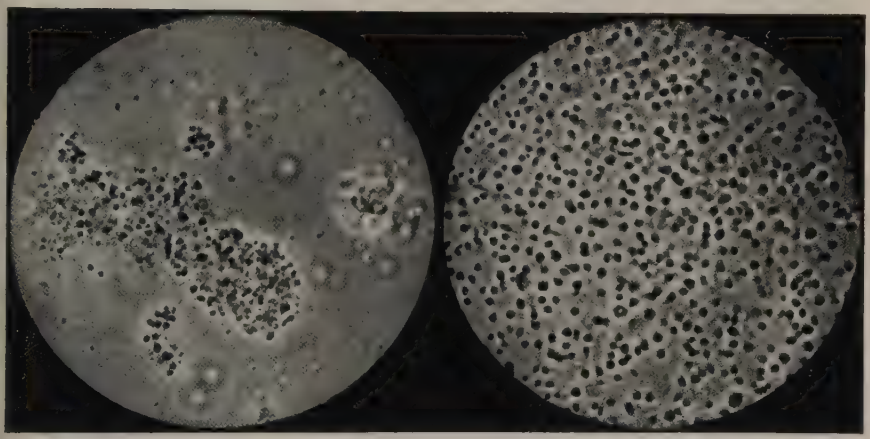
Versuchsanordnung. Je 0,1 ml Thrombocytensuspension wurden mit 0,05 ml 0,9% NaCl-Lösung oder 0,05 ml Hirudinlösung versetzt und durch Zugabe von 0,05 ml m/20 $CaCl_2$-Lösung recalcifiziert. Der Thrombocytengehalt beträgt sodann 500000/ml. Danach wurden den Ansätzen je 0,02 ml Thrombinlösung hinzugefügt.

Die Agglutination der Blutplättchen wurde im Phasenkontrastmikroskop verfolgt und nach verschiedenen Zeitabständen die Zahl der nichtagglutinierten, einzelnen Thrombocyten in der Zählkammer bestimmt.

In Ansätzen ohne Hirudin beginnt die Agglutination der Thrombocyten 3—5 min nach dem Recalcifizieren des Ansatzes und ist nach 5 bis 7 min beendet. Bei gleichzeitigem Zusatz von 10 NIH-E Thrombin/ml mit der $CaCl_2$-Zugabe agglutinierten die Thrombocyten innerhalb 20 bis 30 sec. Die Agglutinate sind auch makroskopisch erkenntlich. Die Zahl der einzelnen, nicht agglutinierten Thrombocyten liegt unter 10000/ml (Abb. 1a).

In Parallelansätzen, die zuvor mit Hirudin (10 γ/ml = 85 AT-E/ml) versetzt worden waren, verursachte die gleiche Thrombinmenge keine Agglutination (Abb. 1 b). Nach 2 Std wurden noch 3—400000 einzelne Thrombocyten/ml gezählt. Wurde zu diesen Ansätzen eine dem Hirudin äquivalente Menge Thrombin (85 NIH-E/ml) hinzugefügt, so agglutinierten die Thrombocyten nunmehr auch in diesem Ansatz innerhalb von 20—30 sec.

Der Einfluß des Hirudins auf die Aktivierung des Proaccelerins. Beim Ablauf der Blutgerinnung ist das Accelerin (Faktor VI) an der schnellen



a b

Abb. 1. Thrombocytensuspensionen in defibriniertem Citratplasma (Phasenkontrastmikroskop Vergrößerung 400mal). a ohne Hirudin; b mit 10 γ Hirudin/ml; 5 min nach dem Recalcificieren und Zusatz von 10 NIH-E Thrombin/ml

und vollständigen Umwandlung des Prothrombins zum Thrombin wesentlich beteiligt. Der aktive Accelerator entsteht unter dem Einfluß von Thrombin aus seiner weniger aktiven Vorstufe, dem Proaccelerin (Faktor V) (Ware u. Seegers).

Von der Wirkung dieses Gerinnungsfaktors kann man sich überzeugen, wenn man die Gerinnungsbeschleunigung eines Faktors-V armen Plasmas bei Zusatz des Faktors V in Form von gereinigtem Proaccelerin oder normalem Plasma bestimmt (Tab. 1, Ansatz 1 u. 2). Wird das proaccelerinhaltige Präparat vorher mit einer kleinen Menge Thrombin behandelt (die selbst keinen deutlichen Einfluß auf den Gerinnungsablauf hat, Ansatz 3), so beschleunigt es die Gerinnung des Faktor V-Mangelplasmas infolge der vorangehenden Aktivierung des Proaccelerins zum Accelerin stärker (Ansatz 4).

Um festzustellen, ob die proaccelerinaktivierende Wirkung des Thrombins durch Hirudin verhindert werden kann, wurde proaccelerinhaltiges

Plasma einmal vor (Ansatz 5) und einmal nach (Ansatz 6) der Thrombineinwirkung mit Hirudin versetzt. Dabei zeigte sich, daß Hirudin die proaccelerinaktivierende Wirkung des Thrombins verhindert, wenn es in einem genügenden Überschuß vorhanden ist. Die nur äquivalente Menge Hirudin reicht nicht aus, um diese Thrombinwirkung zu verhindern (Ansatz 7). Offenbar muß auch die geringe Dissoziation des Thrombins aus dem Hirudin-Thrombin-Komplex (Dissoziationskonstante der Thrombin-Hirudin-Verbindung $K \sim 10^{-10}$ M) durch einen Überschuß an Hirudin (Ansatz 8 und 9) zurückgedrängt werden, da außerordentlich kleine Mengen von Thrombin bereits ausreichen, um die Aktivierung des Proaccelerins zu bewerkstelligen.

Tabelle 1. *Der Einfluß des Hirudins auf die Aktivierung des Faktors V durch Thrombin*

Aktivierungsansatz Nr.	Faktor V ml	Hirudin ml	Thrombin ml	Hirudin ml	Gerinnungszeit in Sekunden Mittelwert aus 12 Bestimmungen
1	—	—	—	—	218 (± 5)
2	0,05	—	—	—	96 (± 3)
3	—	—	0,05	—	185 (± 4)
4	0,05	—	0,05	—	30 (± 2)
5	0,05	0,05	0,05	—	98 (± 3)
6	0,05	—	0,05	0,05 (nach 30 sec)	34 (± 2)
7	0,05	0,025	0,05	—	39 (± 3)
8	0,05	0,03	0,05	—	62 (± 4)
9	0,05	0,04	0,05	—	96 (± 4)
10	0,05	0,05	—	—	99 (± 4)

Faktor V = frisches Kaninchencitratplasma 1 : 40 mit Veronalacetatpuffer p_H 7,4 verdünnt.
Hirudin = 4 AT-E Hirudin/ml in Veronalacetatpuffer p_H 7,4.
Thrombin = 2 NIH-E Thrombin/ml in Veronalacetatpuffer p_H 7,4.
Mischung der Lösungen in der angegebenen Reihenfolge.
Ansätze mit Pufferlösung auf 0,2 ml aufgefüllt.
Nach 30 sec Zusatz von 0,2 ml Faktor V-Mangelplasma (Menschliches Oxalatplasma 4 Wochen bei + 5° gelagert) und 0,2 ml Thrombokinaselösung in m/40 $CaCl_2$-Lösung.
Messung der Gerinnungszeit bei 25° C. In Klammern ist das Ausmaß der Streuung $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}$ angegeben.

Resorption und Ausscheidung des Hirudins

Für die Wirksamkeit eines Antikoagulans vom Charakter des Hirudins ist die Erzeugung und Aufrechterhaltung einer ausreichenden Konzentration des Stoffes im Blut entscheidend. Da das Polypeptid Hirudin durch die Einwirkung proteolytischer Fermente zerstört wird, kommt nur eine parenterale Applikation in Frage.

Hirudinspiegel im Blut nach intravenöser und subcutaner Injektion. Versuchsanordnung. 2,0—2,5 kg schweren Kaninchen wurden 1,0 ml Hirudinlösung in 0,9% NaCl in die Ohrvene oder unter die Rückenhaut injiziert. Nach verschiedenen Zeitabständen wurden aus der Ohrvene Blutproben entnommen, auf ihren Gehalt an Hirudin untersucht und ihre Gerinnungszeit nach Zusatz von $CaCl_2$ und Thrombokinase bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 2 zusammengefaßt. Der Urin wurde bis 24 Std nach der Hirudininjektion in Stoffwechselkäfigen gesammelt oder durch Massage des Abdomens und manuelle Kompression der Harnblase gewonnen.

Intravenös injiziertes Hirudin verschwindet verhältnismäßig schnell aus dem Blut. Der steile Abfall der „Blutspiegelkurve" (Abb. 2) innerhalb der ersten 10 min nach der intravenösen Injektion läßt sich dadurch erklären, daß unmittelbar nach der Injektion eine Abdiffusion des Hirudins in das Gewebe erfolgt, von wo es nach dem Absinken des Blutspiegels wieder teilweise in das Blut zurückdiffundiert. Nach Ausgleich des anfänglichen Diffusionsgefälles zwischen Blut und extravasalem Flüssigkeitsraum nimmt die Blutspiegelkurve die Form einer einfachen Exponentialfunktion an und fällt bei Eintragung der gemessenen Werte in ein halblogarythmisches Netz geradlinig ab. Bei subcutaner Applikation kann infolge der Verzögerung der Resorption über einen längeren Zeitraum ein niedriger Hirudinspiegel im Blut erzeugt werden.

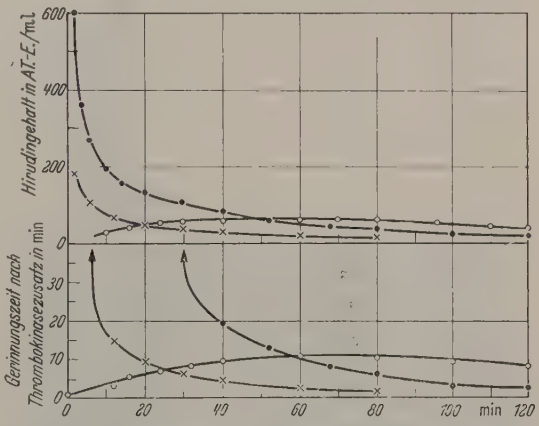


Abb. 2. Hirudingehalt und Gerinnungszeit des Blutes nach der Injektion von Hirudin; •—• Kaninchen 2,3 kg; 200000 AT-E intravenös. ×—× Kaninchen 2,5 kg; 100000 AT-E intravenös. ○—○ Kaninchen 2,4 kg; 200000 AT-E subcutan

Nach der Injektion von Hirudin entnommene Blutproben gerinnen auch auf Zusatz von Thrombokinase nicht, solange der Hirudingehalt ausreicht, um die aus dem vorhandenen Prothrombin entstehenden Thrombinmengen (durchschnittlich 120 NIH-E/ml im Kaninchenblut [MARKWARDT (3)] zu neutralisieren. Sinkt der Hirudingehalt unter 120 AT-E/ml, so reicht die Hirudinmenge nicht mehr aus, um das gesamte sich bildende Thrombin zu binden. Die Gerinnung wird dann nur noch mehr oder weniger verzögert.

Renale Ausscheidung. Im 24 Std-Harn der Versuchstiere wurden 70—80% der intravenös oder subcutan injizierten Hirudinmenge wiedergefunden. Um den Nachweis zu erbringen, daß es sich bei dem über die

Niere ausgeschiedenen blutgerinnungshemmenden Wirkstoff tatsächlich um unverändertes Hirudin handelt, wurden die Harnproben durch Gefriertrocknung eingeengt und papierelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3). Da das im Urin enthaltene Hirudin das gleiche elektrophoretische Verhalten zeigt, wie das zum Vergleich aufgetragene reine Hirudin, kann angenommen werden, daß es in unveränderter Form ausgeschieden wird.

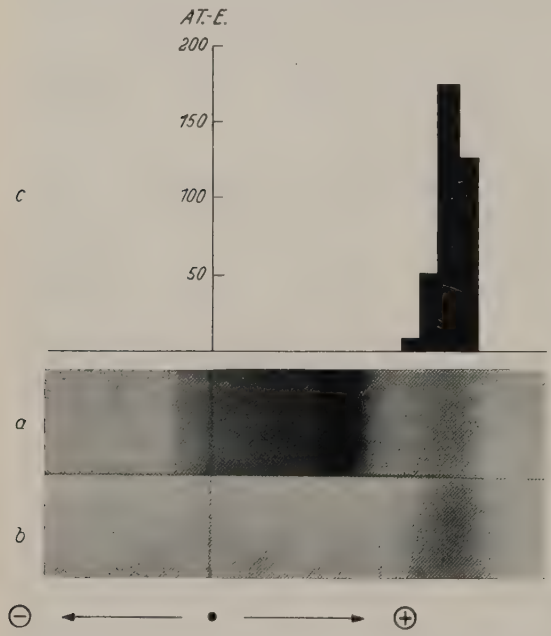


Abb. 3. Nachweis des Hirudins im Urin 120 min nach der intravenösen Injektion von 100000 AT-E. a Elektropherogramm einer Urinprobe (Ammonformiatpuffer p_H 5,0; 8 V/cm, 0,8 mA/cm; Laufzeit 180 min bei + 2° C; Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B); b Elektropherogramm des zum Vergleich aufgetragenen reinen Hirudins; c Austestung des Elektrophoresestreifens a in AT-Einheiten

Unter Anwendung des beschriebenen Verfahrens zur Isolierung des Hirudins [MARKWARDT (1)] konnte außerdem ein Teil der angewandten Hirudinmenge aus dem Harn in reiner Form mit unveränderter spezifischer Aktivität zurückgewonnen werden.

Hirudin-Clearance. Um die Ausscheidung des Hirudins durch die Niere näher zu untersuchen, wurde die Hirudin-Clearance nach i.v. Injektion von 100000 AT-E/Hirudin bestimmt.

Versuchsanordnung. Die Versuche wurden an insgesamt 5 2,0—2,5 kg schweren Kaninchen in Urethannarkose (2,0 g/kg i. p.) durchgeführt. Laparotomie und Einführung von Uretherenkathetern durch die eröffnete Blase vor Beginn des Versuches. Zur Aufrechterhaltung des Urinflusses Dauerinfusion mit hypertonischer NaCl-Lösung (1,4%) während des Versuches (0,5 ml/min). Blutentnahmen aus der freigelegten A. carotis. Erste Blut- und Harnentnahme 15 min nach Versuchsbeginn, weitere alle 15 min. Hirudinbestimmung im Plasma und Urin wie vorher beschrieben. Die Hirudinkonzentration im Plasma für die Mitte jeder Urin-Sammelperiode wurde graphisch ermittelt. Gleichzeitig wurde die Kreatininclearance gemessen. Die Analyse für Kreatinin im Plasma und Urin erfolgte nach der Methode von POPPER, MANDEL u. MAYER. (Zur Berechnung der renalen Clearance vgl. DOST). Die Ergebnisse eines Versuchsbeispiels sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Infolge der nach intravenöser Injektion unmittelbar einsetzenden Abdiffusion des Hirudins in das Gewebe sinkt der Hirudingehalt des Plasmas anfangs schneller als es der gemessenen Ausscheidung im Harn

entspricht. Der Ausscheidungsvorgang kommt erst nach Einstellung des Austauschgleichgewichtes zwischen Blut und Gewebe (nach Ablauf der ersten Periode) in ungestörter Form zum Ausdruck.

Tabelle 2. *Bestimmung der renalen Hirudin-Clearance*

Periode (Dauer je 15 min)	Urin			Plasma Hirudingehalt (Mittelwert) AT-E/ml	Hirudin-Clearance ml/min	Keratin-Clearance ml/min	Clearance Ratio
	Menge ml/min	Hirudingehalt					
		AT-E/ml	Gesamt AT-E				
1	0,42	5000	35280	520	4,0	7,3	0,55
2	0,5	2500	18750	160	7,8	8,2	0,95
3	0,48	1650	11880	110	7,2	7,8	0,92
4	0,44	1200	7920	72	7,2	7,5	0,96
5	0,42	850	5350	52	6,9	6,7	1,03
6	0,40	600	3000	40	6,0	7,4	0,81

Betrachtet man die Kreatininclearance als Maß für das Glomerulusfiltrat, so läßt sich die

$$\text{Clearance Ratio (Cl. R.)} = \frac{\text{Hirudinclearance}}{\text{Glomerulares Filtrationsvolumen}}$$

bestimmen. Die Bestimmung der Cl. R. gestattet eine Entscheidung, ob die Ausscheidung des Hirudins aus dem Blut durch reine Filtration in den Glomerulis bewirkt wird oder ob sie durch aktive Vorgänge in den Tubulis, sei es durch Rückresorption oder Sekretion, beeinflußt wird. Da die Cl. R. nach Einstellung des Austauschgleichgewichtes annähernd gleich 1 ist, läßt sich die renale Clearance durch reine Filtration erklären. Nach 90 min wurden bereits 80% des injizierten Hirudins auf diesem Wege über die Niere ausgeschieden. In diesem Zusammenhang sei an die in vorangegangenen Untersuchungen [Markwardt (2)] getroffene Feststellung erinnert, daß Hirudin bei Ultrafiltrationsversuchen Collodiummembranen und Ultrafeinfilter mit einer Porenweite von 10—20 mμ an aufwärts ungehindert durchdringt.

Toxicitätsbestimmungen

Nach der Injektion von Hirudinmengen, wie sie im vorhergehenden Abschnitt zur Bestimmung der Resorption und Ausscheidung benutzt wurden (bis zu 10 mg/kg intravenös und subcutan) konnten keine toxischen Nebenreaktionen beobachtet werden. Der Blutdruck wurde durch Injektionen von 10 mg/kg Hirudin nicht verändert (Blutdruckregistrierung mit dem Hg-Manometer in der A. carotis. Injektion in die kanülierte V. femoralis). Bei Versuchen zur Bestimmung der tödlichen Dosis durch intraperitoneale Injektion an weißen Mäusen wurde 1 g/kg vertragen. Bestimmungen mit höherer Dosierung wurden nicht durchgeführt, da

die dafür notwendigen Substanzmengen für diese Versuche nicht aufgebracht werden konnten. Wiederholte Injektion mit Intervallen bis zu 2 Wochen ergaben kein Zeichen einer Sensibilisierung.

Die Wirkung des Hirudins gegen Thrombin am Gesamttier

Nachdem Klarheit über Resorption und Ausscheidung des Hirudins gewonnen worden war, konnte die Antithrombin-Wirkung des Stoffes auch im Tierversuch geprüft werden. Zu diesem Zweck wurde versucht, die tödliche Wirkung i.v. injizierten Thrombins durch vorherige Injektion von Hirudin zu verhindern.

Versuchsanordnung. Die Versuche wurden an Kaninchen im Gewicht von 2,0—2,5 kg durchgeführt. Die Tiere wurden in Gruppen von je 6 Tieren eingeteilt. Hirudinlösungen (10000 AT-E/ml gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung) wurden in die linke Ohrvene injiziert. Thrombinlösungen (250 NIH-E/ml, gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung) wurden in Evipannarkose (60 mg/kg i.v.) mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 3 ml/min in die rechte Ohrvene injiziert.

Das Ergebnis der Versuche ist in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3. *Verhinderung der tödlichen Wirkung intravenöser Thrombininjektion durch Vorbehandlung mit Hirudin*

Tiergruppe (je 6 Kaninchen)	injizierte Hirudinmenge in AT-E	Zeitabstand bis zur Thrombininjektion in Minuten	injizierte Thrombinmenge in N I H-E	Zahl der überlebenden Tiere
1	—	—	250	0
2	10000	5	500	6
3	10000	5	1000	2
4	40000	5	1000	6
5	10000	60	250	0

Die schnelle intravenöse Injektion einer ausreichenden Thrombinmenge hat den sofortigen Tod der Versuchstiere durch intravasale Gerinnung zur Folge (Lenggenhager, Mellanby, Astrup u. Volkert, Jürgens u. Studer, Warner u. Mitarb.). Für Kaninchen werden 150 bis 300 Thrombineinheiten als tödliche Dosis angegeben.

In unseren Versuchen führte die Injektion von 250 NIH-E nach wenigen Minuten (1—5 min) zum Tod der Versuchstiere (Gruppe 1). Bei der nachfolgenden Sektion der Tiere fanden sich regelmäßig Thromben im rechten Ventrikel und in den Pulmonararterien.

In hirudinisierten Tieren verursacht die intravenöse Thrombininjektion von 500 NIH-E keine tödliche Gerinnselbildung (Gruppe 2). Die Injektion dieser doppelten tödlichen Dosis blieb auch während einer Beobachtungszeit von über 3 Monaten ohne Nachwirkung.

Bei Steigerung der injizierten Thrombinmenge wurde die Schutzwirkung des Hirudins schließlich durchbrochen (Gruppe 3). Bei Anwendung

größerer Hirudinmengen wurden entsprechend größere Mengen Thrombin vertragen (Gruppe 4).

Erfolgte die Thrombininjektion zu einem Zeitpunkt, an dem die größte Menge des injizierten Hirudins aus dem Blut eliminiert worden war (Gruppe 5) (Kontrolle durch Hirudinbestimmung im Blut), so gingen die Tiere erwartungsgemäß innerhalb weniger Minuten infolge Herzkammertamponade oder massiver Lungenembolie zugrunde.

Die Schutzwirkung des Hirudins gegen experimentelle, durch Gefäßwandschäden ausgelöste Thrombosen

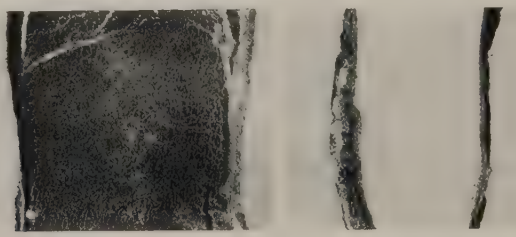
Es wurde versucht, die antithrombotische Wirkung des Hirudins auch bei den durch Gefäßwandläsionen ausgelösten Thrombusbildungen nachzuweisen. Zur Erzeugung eines Gefäßwandschadens wurde Varicocid (10%ige Lösung der Natriumsalze der Fettsäuren des Lebertrans, VEB Arzneimittelwerke Dresden) benutzt, eines der sklerosierenden Mittel, die in der Therapie zur Verödung von Varizen angewandt werden. Es verursacht bei intravenöser Injektion eine Intimaschädigung, wodurch es zur Auslösung von Thrombosierungsvorgängen kommt.

Versuchsanordnung. Die Versuche wurden an insgesamt 51 Kaninchen in Urethannarkose (2,0 g/kg i.p.) durchgeführt. Die V.jugularis externa wurde freigelegt und ein etwa 2 cm langes Venenstück abgeklemmt und ausgestrichen. In den leeren Gefäßabschnitt wurde mit einer feinen Kanüle etwa 0,3 ml Varicocid injiziert. Nach 3 min langer Einwirkung wurden die Klemmen geöffnet, so daß der Inhalt des abgeklemmten Venenstückes durch das zirkulierende Blut weggeschwemmt und verdünnt wurde. Die Wunde wurde durch Auflegen des Hautlappens bedeckt. In Abständen von 15 min wurde die Vene erneut freigelegt und kontrolliert. Nach Eintritt der Thrombosierung läßt sich das Blut aus den behandelten Venenabschnitten nicht mehr ausstreichen. Die distalen Venenanteile erscheinen dunkelblaurot und prall mit Blut gefüllt. Mit Hilfe dieses Zeichens kann man sich leicht von dem Eintritt der Thrombosierung überzeugen. Die Vene wurde sodann mitsamt dem Thrombus reseziert, in Formalin fixiert und in üblicher Weise histologisch untersucht. Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin, Azan, Fibrinanfärbung nach Weigert, van Gieson[1].

Das Ergebnis der Versuche ist in Tab. 4 zusammengefaßt. In einer ersten Versuchsreihe wurde der Zeitpunkt bis zum Eintritt der Thrombosierung bestimmt. Der gesetzte Gefäßwandschaden hatte bei insgesamt 15 untersuchten Tieren nach Ablauf von 30 bis spätestens 60 min eine makroskopisch deutlich erkennbare Thrombose des behandelten Venenabschnittes zur Folge. Das Gefäßlumen ist von einem gemischten Thrombus, bestehend aus einem kleinen wandständigen Abscheidungsanteil und einem größeren Gerinnungsanteil, der kontinuierlich in das stagnierende Blut übergeht, vollständig ausgefüllt (Abb. 4a).

[1] Für die Hilfe bei den histologischen Untersuchungen bin ich Herrn Oberarzt Dr. Werner vom Pathologischen Institut der Universität Greifswald zu Dank verpflichtet.

Bei der zweiten Tiergruppe wurden unmittelbar vor der Gefäßwandläsion 5000 AT-E Hirudin/kg (gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung) durch die Ohrvene injiziert. Die Halsvenen wurden fortlaufend kontrolliert und 8 Std nach der Varicocidinjektion excidiert. Trotz des bestehenden, histologisch nachweisbaren Gefäßwandschadens konnte weder makroskopisch noch mikroskopisch eine Thrombosierung nachgewiesen werden (Abb. 4b). In der 3. und 4. Tiergruppe wurde der Gefäßwandschaden 2 Std und 5 Std nach der Hirudininjektion (5000 AT-E/kg) gesetzt.



a b

Abb. 4. Verhinderung der durch Gefäßwandschäden ausgelösten Thrombusbildung durch Hirudin. Längsschnitt durch die Vena jugularis externa des Kaninchens. 8 Std nach der Gefäßwandschädigung (siehe Versuchsanordnung) excidiert und in Formol fixiert. (Färbung: Azan; Vergrößerung: 10mal). a Kaninchen ohne Hirudin; b Kaninchen unmittelbar vor der Gefäßwandschädigung mit 5000 AT-E Hirudin/kg i.v. behandelt

2 Std nach der Hirudininjektion konnte noch keine Thrombosierung erzwungen werden, während 5 Std nach der Hirudingabe in gleicher Weise wie bei den unbehandelten Kontrolltieren eine Thrombose erzeugt wurde.

Es scheint, daß die durch Varicocid geschädigte Gefäßwand nur in der ersten Zeit nach der Schädigung eine Thrombose auslöst. Bei längerem Fortbestand des Reizes der Gefäßwandläsion hätte sonst auch in den Tiergruppen 2 und 3 nach dem Abklingen der Schutzwirkung des Hirudins (nach 5 Std) eine Thrombosierung erwartet werden müssen.

Tabelle 4. *Hirudinwirkung bei experimentellen Thrombosen*

Gruppe	Zahl der Versuchstiere	Injizierte Hirudinmenge AT-E/kg	Zeitpunkt der Gefäßwandläsionen in Minuten nach der Hirudininjektion	Eintritt der Thrombosierung in Minuten nach der Gefäßwandläsion Mittelwert[1]
1	15	—	—	43,0 (± 16,5)
2	12	5000	1	> 480
3	12	5000	120	> 360
4	12	5000	300	52,5 (± 11,5)

[1] In Klammern ist das Ausmaß der Streuung σ angegeben. Bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $P = 0{,}001$ beträgt der Zufallsbereich für den in der Kontrollgruppe 1 gefundenen Mittelwert 43 + 18, d.h. die Grenzen liegen bei 61 bzw. 25 min. In der Gruppe 2 und 3 wurden die Versuche 8 und 6 Std nach der Gefäßwandschädigung abgebrochen. Diese Zeiten liegen um ein vielfaches außerhalb des Zufallsbereiches.

Besprechung

Als spezifischer Hemmstoff des Thrombins nimmt das Hirudin eine besondere Stellung unter den Anticoagulantien ein. Es stoppt den Gerinnungsvorgang, indem es das Reaktionsprodukt der I. Gerinnungsphase, das Thrombin, abfängt und dadurch die Auslösung der II. Phase, die Fibrinbildung, verhindert. Die Ausschaltung des Thrombins kann sich aber auch auf den normalen Ablauf anderer Reaktionsfolgen im Gerinnungssystem auswirken. Beim natürlichen Gerinnungsvorgang laufen bekanntlich die einzelnen Reaktionen nicht zeitlich getrennt nacheinander ab, sondern sie überschneiden sich. Eine in Gang befindliche Reaktion regt nicht nur den Ablauf der folgenden an, sondern kann auch selbst durch ein entstandenes Reaktionsprodukt rückwirkend beeinflußt werden. Unter physiologischen Bedingungen verläuft auf diese Weise die Thrombinbildung nach den Gesetzen einer autokatalytischen Reaktion, d. h. das Thrombin bewirkt eine Beschleunigung seiner eigenen Entstehung. Dieser autokatalytischen Reaktion kommt für den Gerinnungsvorgang eine besondere Bedeutung zu, da sie eine schnelle Anhäufung des Fermentes und damit eine starke Beschleunigung der Gerinnung zur Folge hat. Da das Thrombin durch seine Bindung mit dem Hirudin auch diejenigen Wirkungen verliert, welche den geschilderten autokatalytischen Reaktionsablauf bedingen, kann das Hirudin auf diesem Wege auch die Geschwindigkeit der Thrombinbildung beeinflussen.

Nachdem das Hirudin als blutgerinnungshemmender Wirkstoff charakterisiert wurde, ist auch die Frage nach seiner Wirkung als Antithromboticum aufgeworfen. Da den Thrombusbildungen trotz verschiedener auslösender Ursachen ein echter Gerinnungsvorgang zugrundeliegt, der ohne Thrombin nicht abläuft, besteht begründete Aussicht, durch Hirudin die Entstehung oder das Fortschreiten einer Thrombose zu verhindern. Von Vorteil ist dabei die spezifische, nur auf das Thrombin gerichtete, Wirkung des Hirudins. Es wirkt erst bei Beginn einer Thrombinbildung, ohne die sonstige Beschaffenheit und Zusammensetzung des Blutes zu ändern. Für die pharmakologische Prüfung der antithrombotischen Wirksamkeit des Stoffes ergibt sich aber die Schwierigkeit, die physiologischen Bedingungen, welche zur intravitalen Blutpfropfbildung führen, im Tierversuch durch experimentell erzeugte Thrombosen nachzuahmen. Mit der Erzeugung reiner Gerinnungsthromben durch intravenöse Injektion von Thrombin dürfte man dem Wesen solcher Gerinnselbildungen nahekommen, die auf Grund einer gesteigerten Gerinnungsbereitschaft des Blutes infolge krankhafter Vermehrung oder Aktivierung von Gerinnungsfaktoren entstehen. Bei den durch Gefäßwandschäden verursachten Thrombenbildungen spielt aber insbesondere die innerhalb alterierter Gefäße gesteigerte Haftfähigkeit und Agglutinationsneigung der Thrombocyten als gerinnungsauslösendes

Moment eine Rolle. Hirudin erweist sich in beiden Versuchsanordnungen als antithrombotisch wirksam.

Besonders beachtlich erscheint uns die Feststellung, daß die durch Gefäßwandläsionen ausgelöste Thrombenbildung bei verhältnismäßig geringen Hirudinkonzentrationen im Blut ausbleibt, die keineswegs ausreichen würden, um das gesamte Thrombin, welches aus dem im Blut vorhandenen Prothrombin gebildet werden kann, zu neutralisieren. Vielleicht wird durch die Blockierung der bei Beginn der Gerinnung entstehenden ersten kleinen Thrombinmenge die Auslösung der beschriebenen physiologischen Kettenreaktion verhindert, welche sonst zur Bildung weiterer Thrombinmengen und damit zur beschleunigten Thrombusbildung führt.

Zusammenfassung

Nachdem das Hirudin in vorangegangenen Untersuchungen als spezifischer Hemmstoff des Thrombins charakterisiert worden war, wurden die Möglichkeiten einer pharmakologischen Beeinflussung der Blutgerinnung durch diesen Stoff im Reagensglas und in Tierversuchen geprüft.

Durch seine Bindung mit Hirudin verliert das Thrombin nicht nur seine augenfälligste Wirkung, die Fibrinogenumwandlung, sondern auch seine für den autokatalytischen Reaktionsablauf der Thrombinentstehung und für die Thrombusbildung wichtigen Nebenfunktionen: die Förderung der Thrombocytenagglutination und die Aktivierung des Faktors V.

Experimentelle, durch intravenöse Injektion von Thrombin oder durch Gefäßwandschädigung ausgelöste Thrombenbildungen können durch Hirudin verhindert werden.

Hirudin wird nach der Injektion relativ schnell über die Nieren durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Im Harn werden bis zu 80% der injizierten Hirudinmenge in unveränderter Form wiedergefunden. Das reine Hirudin verursacht bei den hier geschilderten Tierversuchen keine toxischen Nebenwirkungen.

Literatur

Astrup, T., u. M. Volkert: Acta med. scand. **115**, 393 (1943).
Bodong, A.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **52**, 242 (1905).
Bounameaux, Y.: Arch. int. Physiol. **63**, 243 (1955).
Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Wien: Deuticke 1955.
Dost, F. H.: Der Blutspiegel. Leipzig: Thieme 1953.
Ducuing, J., C. Soula, A. Miletzky et M. Waysbort: Sang **2**, 240 (1928).
Emile-Weil, P., et Boyé: C. R. Soc. Biol. (Paris) **66**, 516 (1909).
Fonio, A.: Schweiz. med. Wschr. **1923**, 36.
Haycraft, J. B.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **18**, 209 (1884).

Josserand, A., et J. Jeannin: C. R. Soc. Biol. (Paris) **97**, 493 (1927).
Jürgens, R.: Z. exper. Med. **63**, 74 (1928).
Jürgens, R., u. A. Studer: Helv. physiol. pharmacol. Acta **5**, C 42 (1947).
Kaposi, H.: Mitt. Grenzgeb. Med. Chir. **13**, 373 (1904).
Kohan, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **61**, 132 (1909).
Lenggenhager, K.: Mitt. Grenzgeb. Med. Chir. **44**, 175 (1935).
Loeffler, L.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **117**, 189 (1926).
Marbet, R., u. A. Winterstein: Experientia (Basel) **10**, 273 (1954).
Markwardt, F.: (1) Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **308**, 147 (1957).
Markwardt, F.: (2) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 389 (1956).
Markwardt, F.: (3) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 487 (1958).
Markwardt, F., u. P. Walsmann: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **312**, 85 (1958).
Marshall, E. K.: J. Pharmacol. exp. Ther. **7**, 157 (1915).
Mellanby, J.: Proc. roy. Soc. B **113**, 93 (1933).
Nandris-Calugareanu, A.: C. R. Soc. Biol. (Paris) **101**, 313 (1929).
Rimann, H., u. W. Wolf: Z. Chirurgie **97**, 177 (1909).
Robertis, E. de, P. Paseyro and M. Reissig: Blood **8**, 587 (1953).
Sahli, H.: Zbl. inn. Med. **15**, 497 (1894).
Seegers, W. H.: Advanc. Enzymol. **16**, 23 (1955).
Sievert, W.: Z. exp. Path. Ther. **7**, 532 (1909).
Sollmann, T.: A Manual of Pharmacology. S. 426. Philadelphia and London: Saunders 1950.
Stefanini, M.: Acta med. scand. **140**, 290 (1951).
Ware, A. G., and W. H. Seegers: Amer. J. Physiol. **152**, 567 (1948).
Warner, E. D., K. M. Brinkhous, W. H. Seegers and H. P. Smith: Proc. Soc. exper. Biol. (N. Y.) **41**, 655 (1939).
Zatti, P.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **24**, 22 (1948).

Doz. Dr. F. Markwardt, Pharmakologisches Institut der Universität, Greifswald, Friedrich-Loeffler-Straße 23 d

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 530—543 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald

Die Reduktion von Methämoglobin in der ultravioletthestrahlten Haut*

Von

INGE ZLOTOWSKI unter Mitwirkung von JÜRGEN BLANCK

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. August 1958)

In vorangegangenen Arbeiten des Instituts [WELS (1), ORTMANN (1), URBAN (1,2)] ist festgestellt worden, daß die Geschwindigkeit der Reduktionen, welche durch die sulfhydrylhaltige Keimschicht der Haut bewirkt werden, durch Bestrahlung mit der Quarzlampe erhöht wird. An dieser Beschleunigung ist nicht nur das kurzwellige Ultraviolett (U.V.-C.) beteiligt, sondern auch die längerwelligen Anteile (U.V.-B. und U.V.-A.) und sogar noch ein Teil des sichtbaren Lichtes (Violett, Blau und der dem Blau benachbarte Teil des Grüns) [ORTMANN (2)]. Schon aus diesem Grunde haben solche Reduktionsbeschleunigungen ein besonderes physiologisches Interesse; sie sind nicht an die „Höhensonne" gebunden, sondern können überall auf der Erde durch das Sonnenlicht ausgeübt werden, wenn auch die Wirksamkeit mit steigender Wellenlänge rasch abnimmt. Die Aussicht auf eine einfache Analysierbarkeit des Vorganges war schon dadurch gegeben, daß die Reduktionsbeschleunigungen durch das Licht sich nicht nur in der fermentreichen Haut nachweisen ließen, sondern auch in einfachen einphasischen Systemen, z. B. einer wäßrigen Cysteinlösung, der ein wasserlöslicher reduzierbarer Stoff beigemischt war. Für solche Zwecke lassen sich aber auch zweiphasische Modelle finden, welche einerseits die Verhältnisse in der Haut besser nachahmen und andererseits ebenfalls sicher fermentfrei sind. Das ist bei uns in den letzten Jahren durch H. DALIBOR gezeigt worden, der SH-Gruppen oder andere reduzierende Gruppen unauswaschbar an bestimmten Harzen verankerte, ähnlich wie die SH-Gruppen der Haut in den Keimschichtzellen unauswaschbar verankert sind [WALKER (1,2)]. Der Reduktionsvorgang wie auch dessen Beschleunigung durch das Licht spielt sich dann ähnlich wie in der Haut auch beim Harzmodell an Stoffen ab, die in wäßriger Lösung an den reduzierenden Gruppen vorbeistreichen. Diese ragen zwar selbst in das Lösungsmittel Wasser hinein, sind aber, wie erwähnt, rückwärts so verankert, daß sie nicht mit in Lösung gehen.

* Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. P. WELS.

Bei den eingangs aufgeführten älteren Arbeiten des Instituts wie auch bei den neuen Modellversuchen von H. Dalibor wurde die Reduktion an körperfremden Farbstoffsystemen ausgeführt. In den hier vorgelegten Versuchen benutzten wir das körpereigene Farbstoffsystem Hämoglobin-Methämoglobin.

Methodik

1. Herstellung der Methämoglobinlösung. Durch Mull filtriertes Schweineblut wurde bei 5000 Touren zentrifugiert, die Blutkörperchen 2--3mal mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf der Zentrifuge gewaschen und mit der dreifachen Menge destillierten Wassers versetzt. Das entstandene Hämolysat wurde nach zweistündiger Aufbewahrung im Kühlschrank wieder zentrifugiert, wobei sich ein Teil der Stromata absetzt, und schließlich die Blutlösung mit Kaliumferricyanid versetzt (auf 1 ml Blutlösung 10 ml n/1000 Salz). Dann wurde die Lösung im Schnelldialysator nach Brintzinger[1] im Kühlraum bei + 2° C dialysiert. Nach 24stündiger Dialyse war kein Kaliumferricyanid mehr nachweisbar; das bei der Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin entstandene Kaliumferrocyanid konnte dagegen auch nach tagelanger Dialyse mit der Silberfällungsreaktion immer noch in Spuren nachgewiesen werden. Die restlichen Stromata fielen bei der Dialyse aus (vgl. Betke). Den so erhaltenen Dialyserückstand verdünnten wir für die Versuchsansätze auf eine Blutkonzentration 1:40 mit einem Gemisch von 0,9%iger Kochsalzlösung und m/15 Phosphatpufferlösung p_H 6,8 zu gleichen Teilen.

2. Gewinnung und Benutzung von Hautstücken aus Schweineohren. Durchströmungen des ganzen Schweineohres, wie sie an unserem Institut durch P. Ortmann (1) mit Farbstofflösungen ausgeführt und später durch G. Urban (3) auch für den besonderen Fall des Methämoglobins in einigen tastenden Versuchen wiederholt worden waren, führten bei systematischem Arbeiten mit diesem letzteren Stoff zu keinen gut reproduzierbaren Ergebnissen. Weit besser kamen wir beim Methämoglobin zum Ziel, wenn wir Stücke abgezogener Schweineohrhaut auf den Methämoglobinlösungen schwimmen ließen, wie es P. Wels (1) schon vor langer Zeit bei Natriumtelluritlösungen getan hatte. Der zu reduzierende Stoff dringt dann von unter her bis zur sulfhydrylhaltigen Keimschicht der Epidermis vor, wo sich die Reduktion vornehmlich vollzieht. Die dabei vorher zu durchdringende Coriumschichtdicke beträgt das Mehrfache der Epidermisdicke, selbst wenn man die Haut unten ausschabt. Davon überzeugten wir uns an histologischen Schnitten[2]. — Die Schweineohren sind für die Gewinnung von Hautstücken mit gutem Reduktionsvermögen bei Aufbewahrung im Kühlschrank 4 Tage lang brauchbar. Da es unser Ziel war, das Methämoglobin nicht nur von unter her an die sulfhydrylhaltige Keimschicht gelangen zu lassen, sondern von dort nach der Reduktion auch wieder zurückzugewinnen, so mußte die Lösung den Diffusionsweg durch diese Coriumschicht hin und her durchlaufen, was nur schwer zu erreichen ist, wenn das Hautstück ruhig auf der Lösung schwimmt. Wesentlich günstiger liegen die Verhältnisse, wenn die Lösung schaukelnd bewegt wird und dabei die darüber gespannte Haut von unten her ständig bespült. Wir füllten deshalb die Methämoglobinlösung in kleine Petri-Schalen von 50 mm Durchmesser und 11 mm Höhe in einer Schichtdicke von 6 mm ein und legten über die Petri-Schale ein Hautstück, das wir vorsichtig in die Petri-Schale eindrückten, bis es mit dem größten Teil seiner Unterfläche die Flüssigkeit berührte, seitlich aber noch genügend weit über den Rand der Petri-Schale hing, um dort mit

[1] Druckschrift 42-8369-1 o.P. Schott & Gen., Jena.

[2] Herrn Doz. Dr. Schumacher, Anatomisches Institut, danken wir für seine freundliche Hilfe.

einem umgelegten schmalen Stahlband befestigt werden zu können. Dieses Stahlband ließ sich mit einem passend angebrachten Schraubstück fest um die Schale herum anziehen, so daß die überhängende Haut zwischen Stahlband und Außenwand der Petri-Schale fixiert wurde (Abb. 1). Die noch überstehenden Hautpartien wurden am unteren Rand des Stahlbandes abgeschnitten. Schaukelt man dann die Schale mit der Hand, so sieht man bei richtiger Lage des Hautstückes von oben her die Wellen der Flüssigkeit sich auf der mitbewegten Haut abzeichnen.

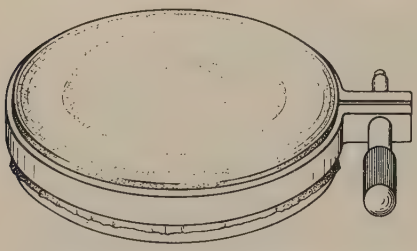


Abb. 1. Schweinehaut über Spülflüssigkeit in kleiner Petri-Schale, durch ein herumgelegtes, mit einer Schraube festziehbares Stahlband fixiert

3. Bestrahlungstechnik. Es wurde eine Überdruck-Quarzlampe (1 Atü) der Firma Steinmann-Allersdorf/Thüringen von der Form der alten „Künstlichen Höhensonne" mit Kippzündung benutzt. Gebrauchsstrom 2,5 Amp./220 V. Die Lampe war in einem Blechkasten untergebracht, aus dem die warme Luft oben entweichen konnte. Im Boden des Kastens waren Halterungen für die Lichtfilter angebracht. Wir verwendeten das Schott-Filter WG 5, welches das Quarzlampenlicht bis zum U.V.-A. durchläßt und das Schott-Filter WG 7, dessen Durchlässigkeit auch das U.V.-B. umfaßt[1]. Außerdem benutzten wir das volle ungefilterte Quarzlampenlicht, das bei diesem Brenner nach unten etwa bis zur Wellenlänge 240 mμ reicht. Die Lampe befand sich 40 cm über den Schalen. — Um bei diesen Schalen gleiche Bestrahlung zu gewährleisten, setzten wir sie zunächst auf eine langsam unter der Quarzlampe rotierende kreisrunde Metallscheibe. Um die Schalen während der Bestrahlung in ständiger Schaukelbewegung zu erhalten, wurde die runde Metallscheibe später in 6 Sektoren aufgeteilt, die an ihrem dem Zentrum zugewandten Ende in Scharnieren beweglich und an ihrem peripherischen Ende mit einem kleinen Gummirad untersetzt waren. Dieses lief auf einem gewellten kreisrunden Metallband (Abb. 2). Durch die Wellung der Unterlage hoben und senkten sich während des Laufens die Sektoren in ihren Scharnieren und brachten dadurch die gewünschte Schaukelbewegung an den auf ihnen stehenden Schalen hervor. 3 von den 6 Sektoren wurden mit einer passend geformten flachen Metallkappe überdeckt, welche die Auf- und Ab-Bewegung der Sektoren nicht hinderte, die Schalen aber vor dem Quarzlampenlicht völlig schützte. Es konnten daher immer bis zu 3 bestrahlte Schalen und ebensoviel unbestrahlte, aber sonst unter völlig gleichen Bedingungen befindliche, Kontrollschalen in den Versuch genommen werden[2]. Während der Bestrahlung wurden die Schalen durch einen Luftstrom gekühlt, der durch einen seitlich aufgestellten kleinen Ventilator erzeugt wurde.

4. Prüfung auf Reduktion. Die Reduktion des Methämoglobins zum Hämoglobin ist bekanntlich schon an dem Farbumschlag leicht erkennbar. Die Methämoglobinlösung ist braun; bei der Reduktion des Methämoglobins zu Hämoglobin wird sie violett, nach dem Durchleiten von Luft oder Sauerstoff nimmt sie die rote Farbe des Oxyhämoglobins an. Für quantitative Aufschlüsse geeigneter ist die Aufnahme des Absorptionsspektrums im sichtbaren Licht. Wir benutzten hierzu

[1] Absorptionsspektrum der Filter in dem Filterkatalog von Schott & Gen., Jena.

[2] Ausführung des Gerätes: Feinmechanikermeister Kurt Geilsdorf, Greifswald, Pharmakologisches Institut.

das „Universal-Spektrophotometer“ von Zeiss-Jena und maßen wie üblich für die einzelnen Wellenlängen die Durchlässigkeit der zu prüfenden Lösung gegen Wasser als Lösungsmittel[1]. Die Versuche wurden immer so angesetzt, daß das Absorptionsspektrum von 3 Lösungen aufgenommen werden konnte: 1. von der in die Schalen eingefüllten Ausgangslösung, 2. von der gleichen Lösung nach Schaukeln unter unbestrahlter Schweinehaut, 3. von der gleichen Lösung nach Schaukeln unter

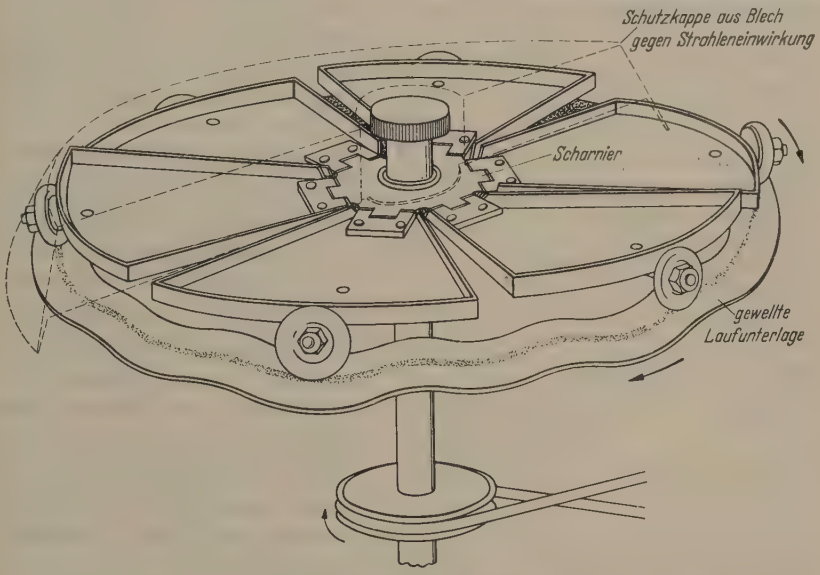


Abb. 2. Schaukelapparat zur Bespülung der Schweinehaut während der Bestrahlung

bestrahlter Schweinehaut. — Für die spektralanalytische Messung verdünnten wir die Lösungen mit dest. Wasser auf eine Blutkonzentration 1 : 100 und schüttelten sie kräftig mit Luft.

Versuchsergebnisse

1. Methämoglobinreduktion durch Schweinehaut unter der Bestrahlung mit vollem Quarzlampenlicht. Abb. 3 zeigt ein typisches Versuchsbeispiel nach einer Bestrahlungszeit von 2½ Std mit vollem Quarzlampenlicht. Man sieht, daß das Absorptionsspektrum der unter der unbestrahlten Schweinehaut geschaukelten Methämoglobinlösung (Kurve 2) nur geringe Abweichungen von dem Spektrum der Ausgangslösung (Kurve 1) aufweist. Die für das Oxyhämoglobin charakteristischen beiden Erhebungen im Grün sind nur eben angedeutet; die für Methämoglobin typische Absorptionsbande im Rot (bei 630 mμ) ist erhalten geblieben. Die unter der bestrahlten Schweinehaut geschaukelte Lösung (Kurve 3) weist dagegen das fast voll ausgebildete Spektrum des Oxyhämoglobins mit der breiten Absorptionsbande bei 540 mμ und der schmäleren Absorptionsbande bei 575 mμ auf, während das Absorptions-

[1] Unter Anleitung von Diplomphysiker Jürgen Blanck.

band im Rot fast verschwunden ist. Von 52 Versuchen dieser Art fielen 48 in der beschriebenen Weise aus, wenn auch der Unterschied nicht bei allen so groß war wie in der Abbildung. Die restlichen 4 Versuche zeigten keinen deutlichen Unterschied der Kurven 2 und 3, ohne daß wir die Ursache sicher ausfindig machen konnten. Man muß wohl annehmen, daß die Haut in einem geringen Prozentsatz der Fälle von vornherein kein ausreichendes Reduktionsvermögen besitzt oder daß dieses beim Lagern im Kühlschrank schneller erlischt und durch Bestrahlung nicht wiederherstellbar ist (vgl. aber Abschn. 7).

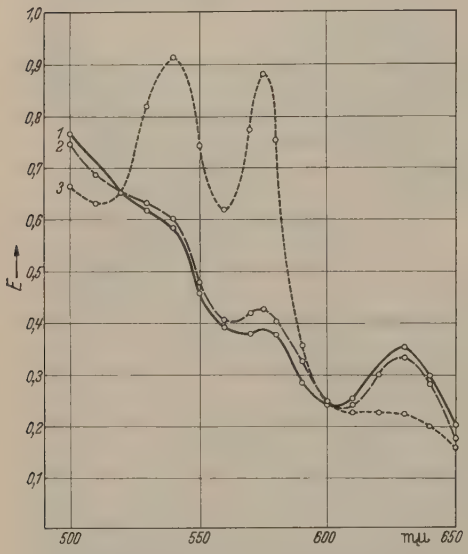


Abb. 3. Bildung von Oxyhämoglobin aus Methämoglobin durch die bestrahlte Schweinehaut. *1* o——o Met-Hb Ausgangslösung 1 : 100; *2* o— — o Met-Hb + Schweinehaut, unbestrahlt; *3* o----o Met-Hb + Schweinehaut, 2½ Std volles Quarzlampenlicht

2. Versuche zur Verkürzung der Bestrahlungszeit. Wie schon im Abschnitt „Methodik" hervorgehoben wurde, ist der Diffusionsweg, den das Methämoglobin durch die Coriumschicht hindurch bis zu der in erster Linie reduktiv wirksamen Keimschicht hin zu nehmen hat, ein verhältnismäßig langer. Hinzu kommt, daß das reduzierte Methämoglobin, um wieder in die Lösung zu gelangen und dort nachweisbar zu sein, auch den ebenso langen Rückweg zu durchlaufen hat. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß die für einen deutlich (wie in Abb. 3) nachweisbaren Reduktionseffekt benötigte lange Bestrahlungszeit von 2½—5 Std gar nicht allein für die Reduktionsbeschleunigung durch das Licht in der Keimschicht verbraucht wird, sondern zum größten Teil für den Hin- und Rückweg zu und von diesem Reduktionsort. Diese Vermutung bestätigte sich: Wir beschaukelten die Haut vor der Bestrahlung 1 Std lang von unter her mit der Methämoglobinlösung, bestrahlten ½ Std unter Weiterschaukeln und setzten dann die Beschaukelung ohne Bestrahlung 1 Std lang fort. Dann bestrahlten wir unter fortgesetztem Schaukeln wieder ½ Std und setzten das Schaukeln danach nochmals eine weitere Stunde ohne Bestrahlung fort. Der Zeitaufwand betrug dann insgesamt 4 Std, enthielt aber nur eine Bestrahlungszeit von 1 Std. Der Effekt im Absorptionskurvenbild war der gleiche wie in Abb. 3, welche einen Versuch mit 2½mal so langer Bestrahlung wiedergibt.

Dazu sei in Ergänzung des Abschnittes „Methodik" noch folgendes bemerkt: Bei der hier beschriebenen Schaukelmethode mit abgezogener Schweinehaut ist die Aussicht, daß der zu reduzierende Stoff aus dem Reduktionsort, der sulfhydrylhaltigen Keimschicht der Epidermis, wieder zurück in die Flüssigkeit gelangt, weit größer als bei der Durchströmung des ganzen Ohres. Dort gelangt zwar der Stoff bis in die Capillaren der Coriumpapillen, also näher an die gefäßlose Keimschicht heran und hat deshalb einen kürzeren Hinweg, als wenn er in der abgezogenen Haut durch die ganze noch darangebliebene Coriumschicht diffundieren muß. Der Rückweg von der Keimschicht in die Coriumcapillaren und damit in den Flüssigkeitsstrom ist aber sehr erschwert, weil die Rückdiffusion entgegen dem ständig gleichbleibenden hydrostatischen Druck der Durchströmungslösung erfolgen muß. Außerdem wird die Haut bei der Schaukelmethode vom Corium her ständig mit dem gleichen Flüssigkeitsvolumen bespült, während bei der Durchströmung des ganzen Ohres immer neue Durchströmungsflüssigkeit nachläuft. Man kann diese zwar nach dem Ausfluß aus der Ohrvene wieder in das Vorratsgefäß zurückgießen und sie so das Ohr mehrmals passieren lassen, dennoch bleibt hierbei das sich schließlich ergebende Verhältnis von Ohrmasse und Ohroberfläche einerseits und benötigtem Flüssigkeitsvolumen andererseits für die Anreicherung des reduzierten und zurückdiffundierten Stoffes ungünstig, zumal auch das Ohr immer nur auf der einen Seite, d.h. nur auf der Hälfte der durchströmten Haut bestrahlt werden kann. Bei der Schaukelmethode dagegen fällt der ganze ungenützte Ballast von Muskulatur, Fett, Knorpel und unbestrahlter Haut fort, und es steht für den Austausch zwischen Flüssigkeit und Gewebe nur das wirklich bestrahlte Epidermisstück mit der vergleichsweise nur dünnen unten daranhängenden Coriumschicht zur Verfügung.

Da es sich hier um einen Reduktionsvorgang handelt, der ganze Versuch aber bei Gegenwart von Luft abläuft, so liegt ferner die Frage nahe, ob sich der Reduktionseffekt durch Stickstoffzufuhr verbessern und durch Sauerstoffzufuhr verschlechtern läßt. Es wurde zur Prüfung dieser Frage am Rande des Schälchens schräg durch die hineinhängende und außen durch das Stahlband fixierte Schweinehaut eine Kanüle gestochen und mit einer angesetzten Spritze die mit Stickstoff oder Sauerstoff vordurchströmte Methämoglobinlösung unter der durchstochenen Schweinehaut in das Schälchen eingefüllt. Dann lösten wir die Spritze, zogen die Kanüle soweit zurück, daß sich ihre Spitze nur noch in dem Luftraum zwischen Lösung und Haut befand, verbanden sie mit einer Stickstoff- oder Sauerstoff-Flasche und verdrängten die Luft zwischen Haut und Flüssigkeit durch das Gas, welches durch eine zweite, am gegenüberliegenden Rande des Schälchens eingestochene Kanüle entwich. Dann zogen wir beide Kanülen heraus. Infolge des schrägen Einstichs der dünnen Kanülen schlossen sich die Einstichstellen, soweit man das feststellen konnte, durch die elastischen Fasern der Haut vollständig. Man erreicht auf diese Weise natürlich keine reine Stickstoff- oder Sauerstoffatmosphäre in dem Objekt, sicher aber eine Verminderung oder Vermehrung des Sauerstoffgehaltes. Im Absorptionskurvenbild ergab sich der erwartete Effekt und ließ sich in 5 Versuchen reproduzieren: Bei Stickstoff ist die Absorptionskurve des schließlich gebildeten Oxyhämoglobins am höchsten, bei Sauerstoff am niedrigsten, bei Luft liegt sie dazwischen.

3. Methämoglobinreduktion durch Schweinehaut unter der Bestrahlung mit gefiltertem Quarzlampenlicht. Durch das Schott-Filter WG7 wird, wie im Abschnitt „Methodik" schon erwähnt wurde, der größte Teil des U.V.-C. des Quarzlampenlichtes (Wellenlängen unter 280 mμ) ausgeschaltet. Wir nahmen die Versuche mit diesem Filter in der gleichen Anordnung vor wie die Versuche mit ungefiltertem Quarzlampenlicht

(Abschnitt 1). Das Ergebnis war in bezug auf die Absorptionsmaxima im wesentlichen das gleiche: Von 31 Versuchen ergaben 30 eine deutliche Steigerung der Reduktion bei der bestrahlten Haut gegenüber der unbestrahlten mit den charakteristischen Kurvenerhebungen an den gleichen Stellen wie in Abb. 3. Das Quarzlampenlicht wirkt also auch noch stark beschleunigend auf die Reduktion des Methämoglobins in der Haut, wenn das U.V.-C. schon weitgehend ausgeschaltet wird. Immerhin war diese beschleunigende Wirkung durch das Filter schon merklich abgeschwächt. Ein ebenso großer Effekt wie in Abb. 3 wurde unter sonst gleichen Bedingungen mit ungefiltertem Licht im Mittel schon in 59% der Zeit erreicht, die bei gefiltertem Licht notwendig war.

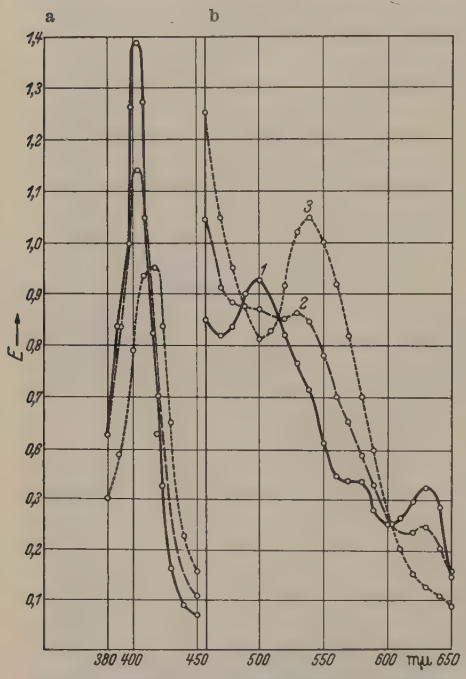


Abb. 4. Bildung von Cyanmethämoglobin durch Bestrahlung von Methämoglobin ohne Schweinehaut. a Verdünnung der Blutlösung 1:1000; b Verdünnung der Blutlösung 1:100.
1 o——o Met-Hb, Ausgangslösung;
2 o– – –o Met-Hb, 30 min volles Quarzlampenlicht;
3 o-----o Met-Hb, 120 min volles Quarzlampenlicht

4. Bildung von Cyan-Methämoglobin. Es bleibt die Frage zu beantworten, was mit der Methämoglobinlösung geschieht, wenn sie unmittelbar, also ohne Bedeckung mit Schweinehaut, bestrahlt wird.

Sowohl bei Bestrahlung mit vollem Quarzlampenlicht wie auch bei Filterung durch WG7 wurde unter diesen Bedingungen keine Reduktion des Methämoglobins zu Hämoglobin erreicht, vielmehr schlug die braune Methämoglobinfarbe in ein tiefes Kirschrot um und auch das Spektrum wies deutliche Veränderungen auf, welche auf die Entstehung von Cyan-Methämoglobin hinwiesen (Abb. 4).

Zum Verständnis dieser Veränderungen muß hier auf den Vergleich zwischen Oxyhämoglobin und Cyan-Methämoglobin etwas näher eingegangen werden. Beim Oxyhämoglobin pflegt man meistens nur die beiden charakteristischen Maxima im Grün (bei 540 und 575 mμ) zu betrachten. Das Oxyhämoglobin hat aber noch ein drittes Maximum im Blau (bei etwa 415 mμ). Auch das Cyan-Methämoglobin hat ein Maximum im Blau, das zwar dicht daneben gelegen ist (bei 420 mμ), sich aber bei der spektralanalytischen Messung doch gut von dem Maximum des Oxyhämoglobins im Blau unterscheiden läßt. Im Grün hat das Cyan-Methämoglobin nur ein Maximum (bei 540 mμ), das mit dem breiteren Maximum des Oxyhämo-

globins zusammenfällt. Das schmälere Maximum des Oxyhämoglobins (bei 575 mμ) fehlt beim Cyan-Methämoglobin.

An diesen spektralanalytischen Kriterien ist das Auftreten des Cyan-Methämoglobins leicht zu erkennen. In der Abb. 4 mußten die Absorptionsspektren im Blau bei einer stärkeren Verdünnung der Versuchslösung gemessen werden als die Absorptionsspektren im Grün, weil die Absorption im Blau viel größer ist als im Grün.

Das Cyan-Methämoglobin trat jedoch nur dann auf, wenn das Methämoglobin mit Kaliumferricyanid hergestellt worden war. Das Auftreten ist offenbar durch das dabei entstandene Kaliumferrocyanid bedingt, das im Gegensatz zum Kaliumferricyanid durch Dialyse nicht völlig entfernt werden kann (vgl. Abschnitt „Methodik"). Bei der Bestrahlung wird aus dem Kaliumferrocyanid Blausäure freigelegt. Wurde das Methämoglobin in der Blutlösung nicht durch Kaliumferricyanid erzeugt, sondern durch Kaliumpermanganat oder auch durch lange Bestrahlung mit Quarzlampenlicht bei Sauerstoffgegenwart (Hasselbalch), so entstand in unseren Versuchen niemals Cyan-Methämoglobin. Im ersteren Falle trübten sich die Lösungen bei der unmittelbaren Bestrahlung ohne Schweinehaut, im letzteren Falle entstand ein brauner Niederschlag, während die überstehende Lösung farblos wurde. Auch hierbei kam es in keinem Falle zu einer Reduktion des Methämoglobins. Diese trat bei unseren Versuchsanordnungen nur unter der bestrahlten Schweinehaut ein.

Die Bildung des Cyan-Methämoglobins in cyanhaltigen Methämoglobinlösungen im Licht ist seit langem bekannt. 1895 berichtete Bock, daß Met-Hb unter der Einwirkung von Sonnenlicht in „Photo-Met-Hb" umgewandelt wird, Haldane sprach sich für die Identität des Photo-Met-Hb mit dem Cyan-Met-Hb aus. Leers untersuchte das Verhalten von cyanfreien ($KMnO_4$, KNO_2, Amylnitrit u. a.) und cyanhaltigen (Kaliumferricyanid) Methämoglobin-Lösungen bei der Bestrahlung mit Sonnenlicht. Nur die cyanidhaltigen Lösungen ergaben das sogenannte Photo-Met-Hb. Den gleichen Effekt wie Kaliumferricyanid brachten auch Kaliumferrocyanid, Ferri- und Ferrocyannatrium und andere Cyanverbindungen hervor. Nicht nur durch Quarzlampenlicht, sondern auch durch das Sonnenlicht wird aus den Cyanverbindungen Blausäure freigelegt, welche die Umwandlung von Met-Hb zu Cyan-Met-Hb bewirkt. Pro Mol Blutfarbstoff wird dabei 1 Mol HCN aufgenommen. Schon Haldane hat darauf hingewiesen, daß eine stark verdünnte Kaliumferricyanidlösung, die vorher einige Zeit dem Sonnenlicht ausgesetzt worden war, beim Zusatz zu einer Methämoglobinlösung Cyan-Methämoglobin bildet.

5. Versuche mit SH-Giften. Um auch in diesen Versuchen mit abgezogener Schweinehaut nochmals die schon in früheren Arbeiten des Instituts bei Durchströmungsversuchen erhärtete Tatsache festzulegen, daß das Reduktionsvermögen der Haut, welches sich durch Belichtung so stark beschleunigen läßt, ganz überwiegend an den in der Keimschicht angehäuften Sulfhydrylgruppen der Haut haftet, vergifteten wir die Haut vor Beginn des eigentlichen Versuches mit neutralisierten Lösungen

der bekannten SH-Gifte Monojodacetat (n/10), p-Chloromercuribenzoesäure (n/100) und Natriumarsenit (n/10), indem wir die Haut mit diesen Lösungen in der beschriebenen Weise von unten her 2 Std lang (ohne Bestrahlung) beschaukelten. Nach gründlichem Abspülen der Hautstücke mit Kochsalzlösung brachten wir sie in der beschriebenen Weise über Methämoglobinlösung und schaukelten sie wie in den Hauptversuchen 4—6 Std lang unter Bestrahlung, bei gleichzeitigem Ansatz strahlengeschützter Kontrollportionen. Es zeigte sich, daß jede Reduktion ausblieb. Die Lösungen blieben braun und zeigten auch im Spektrum die in Abb. 3 sichtbaren Veränderungen nicht.

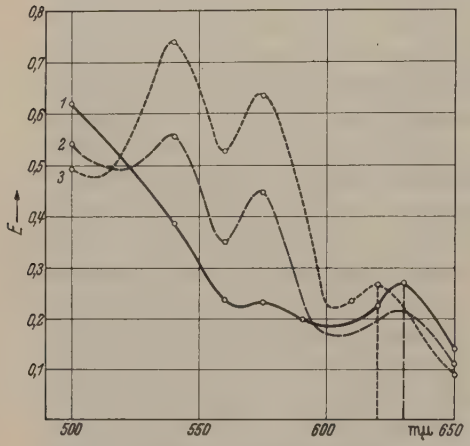


Abb. 5. Verstärkte Oxyhämoglobinbildung aus Methämoglobin durch Glutathion bei Bestrahlung. Maximum des Sulfhämoglobins (Kurve 3) bei 620 mμ; Maximum des Methämoglobins (Kurve 1) bei 630 mμ. *1* o——o Met-Hb, Ausgangslösung 1 : 100; *2* o— — —o Met-Hb + Glutathion, unbestrahlt; *3* o-----o Met-Hb + Glutathion, 15 min volles Quarzlampenlicht

6. Versuche mit Glutathion, Cystein, Dimercaptopropanol und Ascorbinsäure. Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Hautversuche wurden durch Versuche mit Lösungen der einfachen SH-Körper Cystein (n/10), Glutathion (n/10) und Dimercaptopropanol (n/2000) ergänzt. Zum Vergleich wurde als nicht SH-haltiger, aber ebenfalls stark reduzierender Stoff die Ascorbinsäure (n/10) herangezogen. Abb. 5 zeigt ein Versuchsbeispiel mit Glutathion. Ganz ähnliche Verhältnisse ergaben die Versuche mit Cystein. Man sieht, daß hierbei schon ohne Bestrahlung (Kurve 2) nach einer Reduktionszeit von 15 min das Spektrum des Oxyhämoglobins deutlich hervortritt. Bestrahlt man während dieser Zeit mit vollem Quarzlampenlicht, so werden die beiden charakteristischen Maxima im Grün stark erhöht (Kurve 3). Offenbar wird der Reduktionsvorgang durch das Quarzlampenlicht „angeregt", wie das schon in den früheren Arbeiten des Instituts bei der Reduktion verschiedener körperfremder Farbstoffe an gelösten einfachen SH-Körpern festgestellt worden ist. Wahrscheinlich spielt sich die Anregung nicht in dem Reduktionsmittel, den SH-Gruppen, sondern in dem Farbstoffmolekül ab, denn die Anregung setzt voraus, daß die Strahlung in dem anzuregenden Molekül absorbiert wird. Nun wirkt aber bei den von unserem Institut früher untersuchten Reduktionsvorgängen meistens schon das langwellige Ultraviolett und sogar noch das anschließende sichtbare Licht anregend. Diese Wellenlängen aber werden wohl von den

angebotenen reduzierbaren Stoffen absorbiert, dagegen nicht von Sulfhydrylsubstanzen wie Cystein. Man könnte aus solchen Versuchen mit einfachen SH-Körpern vermuten, daß auch die Reduktionsbeschleunigungen in der Haut durch Erzeugung von Anregungszuständen in den Molekülen des zu reduzierenden Stoffes herbeigeführt werden oder zum wenigsten möglich sind (vgl. jedoch Abschnitt 7 der vorliegenden Arbeit).

Bemerkenswert ist, daß in der bestrahlten Portion neben dem Oxyhämoglobin auch Sulfhämoglobin entsteht, charakterisiert durch ein Maximum bei 620 mμ, das deutlich verschieden ist von dem für Methämoglobin typischen Maximum bei 630 mμ (Kurve 1). Auch das ist schon seit langem bekannt (Hoppe-Seyler).

Filtert man das Quarzlampenlicht bei diesen Versuchen durch WG7, so werden die Oxyhämoglobinmaxima wesentlich niedriger und das für Sulfhämoglobin typische Maximum bei 620 mμ tritt erst nach wesentlich längerer Bestrahlung (30—45 min) auf.

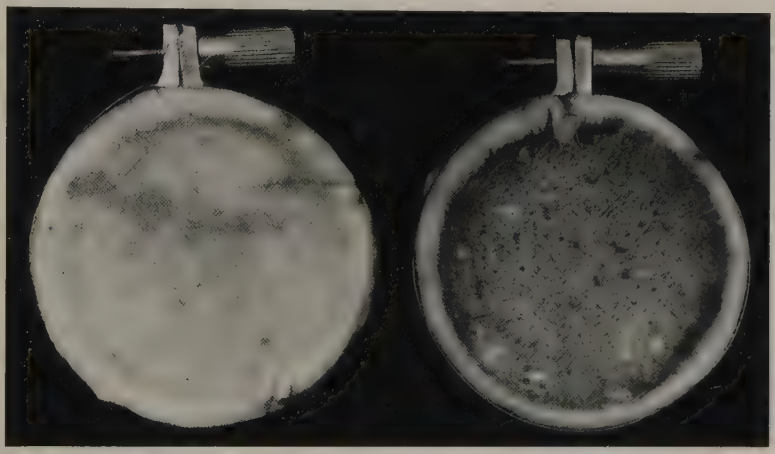
Sowohl bei ungefiltertem wie auch bei gefiltertem Licht erfolgt die durch Strahlen beschleunigte Reduktion des Methämoglobins nicht bis zur völligen Umwandlung in Oxyhämoglobin. Mit zunehmender Bestrahlungszeit tritt daneben eine Umbildung des Methämoglobins in Cyan-Methämoglobin auf und zwar sowohl des ursprünglichen Methämoglobins wie auch des Methämoglobins, das sich aus dem reduktiv entstandenen Oxyhämoglobin bei Fortsetzung der Bestrahlung wieder bilden kann, nachdem das Glutathion oder Cystein oxydativ verbraucht ist. Im Spektrum drückt sich letzteres durch das Verschwinden der für das Oxyhämoglobin charakteristischen Kurvenform, insbesondere durch das Verschwinden des Maximums bei 575 mμ aus. Das andere Maximum im Grün bei 540 mμ dagegen, das auch dem Cyan-Methämoglobin eigen ist (vgl. Abschnitt 4) bleibt bestehen und wächst bei weiterer Bestrahlung sogar an. Wesentlich anders als Glutathion und Cystein verhält sich das Dimercaptopropanol. Es reduziert zwar trotz der 200 mal schwächeren Konzentration ohne Bestrahlung das Methämoglobin etwa in gleichem Maße wie Glutathion und Cystein, bei der Bestrahlung aber zeigt sich keinerlei Beschleunigung der Reduktion, im Gegenteil, die Hauptmaxima der Absorptionskurve fallen flacher aus, sowohl nach Bestrahlung mit dem vollen Licht wie auch mit dem durch WG7 gefilterten Licht. Das Dimercaptopropanol wird durch die Bestrahlung rasch zerstört, wovon man sich leicht dadurch überzeugen kann, daß man die Lösung vorher allein bestrahlt und erst hinterher Methämoglobinlösung hinzufügt. Die bestrahlten Lösungen von Dimercaptopropanol reduzieren dann schwächer als die unbestrahlten. — Benutzt man das Dimercaptopropanol in derselben Konzentration wie das Glutathion und das Cystein, so entsteht schon ohne Bestrahlung, etwa 10 min nach der Mischung mit der Methämoglobinlösung, ein grüner Farbstoff (wahrscheinlich ein

Verdoglobin) und die Lösung trübt sich. — Auch bei der Ascorbinsäure liegt eine solche starke Strahlenempfindlichkeit vor. Auch Ascorbinsäure reduziert ohne Bestrahlung Methämoglobin rasch. Durch Vorbestrahlung wird dieses Reduktionsvermögen aufgehoben.

Am Ende dieses Abschnittes soll besonders darauf hingewiesen werden, daß auch beim Auftreten von Nebenprodukten (Cyan-Methämoglobin und Sulfhämoglobin) die Auswertung des ins Auge gefaßten Hauptvorganges — der Reduktion des Methämoglobins — möglich ist. Wie unsere Versuche zeigen, läßt sich mit Hilfe der Spektralanalyse die Entstehung der erwähnten Nebenprodukte deutlich vom Hauptvorgang trennen.

7. Neubildung von reduzierenden Substanzen in der Haut unter der Bestrahlung mit vollem und gefiltertem Quarzlampenlicht. Hier seien zum Schluß noch einige Versuche angeführt, die zu keinem völlig geklärten Ergebnis führten, weil die Arbeit aus äußeren Gründen abgebrochen werden mußte, die aber doch brauchbare Hinweise für spätere Untersuchungen geben. In lange zurückliegenden Versuchen [Wels (2)] wurde gefunden, daß bei UV-Bestrahlung von Hühnereiweißlösungen, besonders bei Sauerstoffmangel, SH-Gruppen neu gebildet werden. Man kann sie nach der Bestrahlung mit der Nitroprussidnatrium-Reaktion nachweisen und auch an dem Reduktionsvermögen der bestrahlten Lösung erkennen, wenn man diese nach der Bestrahlung mit passenden Redoxindicatoren versetzt. Im Anschluß daran hat sich das Institut damals bemüht, die gleiche Neubildung von SH auch in der Haut nachzuweisen, doch führten diese Bemühungen zu keinem reproduzierbaren Resultat und wurden nach langer vergeblicher Arbeit aufgegeben [Wels (3)]. Diese alten Versuche wurden jetzt wieder aufgenommen und dazu, wie es damals geschehen war, die Haut von Schweineohren benutzt, die vor dem Versuch 7—9 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt worden waren. Wir folgten dabei der durch die früheren Arbeiten begründeten Vorstellung, daß dann das Reduktionsvermögen der Schweinehaut durch allmähliche Oxydation der SH-Gruppen zu SS-Gruppen verloren gegangen ist und daß dieses Stadium besondere Chancen bietet, eine etwa unter der Bestrahlung erfolgende Wiederaufspaltung der SS-Gruppen zu SH-Gruppen zu erfassen. In den alten Versuchen wurde als Indicator des Reduktionsvermögens vorwiegend das Natriumtellurit verwendet, das zu metallischem Tellur reduziert wird und dadurch die Haut schwarz färbt. Heute bietet sich ein verläßlicherer Reduktionsindicator in dem Di-Tetrazoliumbromid, DTB (Ried u. Gick), dar, das bei der Reduktion ein blaurotes Formazan liefert. Solche Versuche haben ein anderes Ziel als die im Abschnitt 1 beschriebenen. Es handelt sich nicht darum, eine Reduktionsbeschleunigung nachzuweisen, die nur während der Bestrahlung erfolgt und wahrscheinlich auf den außerordentlich kurzfristigen Anregungszuständen (10^{-8} sec und weniger) beruht, die durch das Licht in dem zu reduzierenden Stoff erzeugt werden, sondern es handelt sich um eine Neubildung des reduzierenden Agens in der Haut, welche nach der Bestrahlung lange bestehen bleibt und dann auch in Dunkelreaktionen nachweisbar ist. Es wurde also wieder in unseren Schälchen bei ständigem Schaukeln die Schweinehaut bestrahlt, unter welcher sich diesesmal physiologische Kochsalzlösung, Ringer-Lösung oder destilliertes Wasser befand und zugleich ein unbestrahlter sonst völlig gleicher Kontrollversuch angesetzt. Es wurde mit dem vollen Quarzlampenlicht 30—60 min lang bestrahlt. Dann wurde die Flüssigkeit durch eine Lösung von DTB 1 : 1000 ersetzt und die Schälchen bei Zimmertemperatur ohne weitere Bestrahlung aufbewahrt. Nach 8—12 Std ergab sich deutlich und gut reproduzierbar der aus Abb. 6 ersichtliche

Unterschied: Die unbestrahlt gewesene Haut reduziert das Tetrazoliumsalz nicht oder nur wenig, die bestrahlte Haut tut es in starkem Maße und nimmt die blaurote Farbe des entstandenen Formazans an. Man könnte also schließen, daß tatsächlich die bei langem Lagern durch SH-Oxydation erloschene Reduktionskraft der Haut bei der Bestrahlung mit dem vollen Quarzlampenlicht durch Aufspaltung der gebildeten SS-Bindungen wiederhergestellt wird. Wenn das der Fall wäre, so würde



a b

Abb. 6. Neubildung von SH-Gruppen durch Bestrahlung der abgelagerten Schweinehaut mit vollem Quarzlampenlicht, nachgewiesen durch Reduktion von Di-Tetrazoliumbromid zum blauroten Formazan. a unbestrahlte Haut; b bestrahlte Haut

sich bei der in Ziffer 6 dargelegten Deutung der reduktionsbeschleunigenden Wirkung des Quarzlampenlichtes in der Haut die Frage ergeben, ob die Reduktionsbeschleunigung nicht ebensogut durch Vermehrung der SH-Gruppen in der Haut erklärt werden könnte, zumal die dazu notwendigen Bestrahlungszeiten verhältnismäßig kurz sind.

Gleichwohl sind diese Schlußfolgerungen einstweilen noch nicht sicher genug. In den alten Versuchen des Instituts mit Hühnereiweißlösungen hatte sich nämlich gezeigt, daß zur Neubildung von SH das volle Quarzlampenlicht notwendig ist, welches auch das kurzwellige U.V.-C. enthält. Bei unseren jetzigen Versuchen erhielten wir, wenn auch mit etwas verlängerter Bestrahlungszeit (90 min), ein gleich deutliches Resultat, wenn wir aus dem Quarzlampenlicht das U.V.-C. mit dem Schott-Filter WG 7 abschnitten und sogar auch noch dann, wenn nicht nur das U.V.-C., sondern auch das U.V.-B. mit dem Schott-Filter WG 5 abgeschnitten wurde, so daß in diesem letzteren Falle nur noch der langwellige Anteil des Quarzlampenlichtes mit Wellenlängen über 300 $m\mu$ übrig blieb. Es war dann allerdings eine Bestrahlungszeit von 120 min erforderlich, um ein deutliches Resultat zu erhalten. Abb. 7 zeigt die Wirkung der Bestrahlung durch Filter WG 7. Die Abbildung besagt zwar im Grunde nichts anderes als die Abb. 6, ist aber insofern aufschlußreich, als bestrahlte und unbestrahlte Haut an ein und demselben Hautstück verglichen werden können. Der ungefärbte runde Fleck in der Mitte ist dadurch entstanden, daß hier die Haut vor dem Quarzlampenlicht durch eine aufgelegte runde Bleifolie geschützt war, woraus ersichtlich wird, daß die Reduktion des

Tetrazoliumsalzes mit ziemlich scharfer Abgrenzung auf die bestrahlten Hautpartien beschränkt bleibt. Man kann daraus auf eine verhältnismäßig feste Verankerung der SH- und SS-Gruppen in den einzelnen Keimschichtzellen schließen.

Auch ein anderer Umstand, der die Deutung der Versuche einstweilen noch unsicher macht, darf nicht unerwähnt bleiben. Die alten verläßlichen Arbeiten von Walker (1, 2) haben gezeigt, daß weder die in der Keimschicht der Epidermis vorhandenen SH-Gruppen noch die aus ihnen durch Oxydation entstehenden SS-Gruppen aus der Haut auswaschbar sind. Auf eine solche Fixierung deutet ja, wie schon gesagt, auch die Abb. 7 hin. Daß die Fixierung aber doch wieder auch nicht allzu fest ist, zeigte sich daran, daß bei unseren Versuchen die Reduktionskörper zum Teil in das Schaukelwasser übergingen, das während der Bestrahlung mit der Unterfläche der bestrahlten Haut in Berührung war (NaCl-Lösung, Ringer-Lösung oder dest. Wasser). In diesem Schaukelwasser konnte das Reduktionsvermögen durch die Reduktion von Methämoglobin zu Hämoglobin nachgewiesen werden. Auch das in der unbestrahlten Haut noch vorhandene viel geringere Reduktionsvermögen ließ sich zum Teil auswaschen. Die aus der Haut in das Schaukelwasser übergehenden reduzierenden Stoffe sind SH-Körper, denn ihre Reduktionswirkung auf Methämoglobin ließ sich durch die oben erwähnten SH-Gifte leicht zum Schwinden bringen.

Abb. 7. Neubildung von SH-Gruppen durch mit WG 7 gefiltertem Quarzlampenlicht. Unterschied zwischen unbestrahlter und bestrahlter Haut an ein und demselben Hautstück. Weißer kreisrunder Fleck in der Mitte: vor der Bestrahlung geschützt gewesene Haut

Hier ist also noch Verschiedenes zu klären, doch ermöglicht die beschriebene Schaukelmethode mit der abgezogenen Haut ein einfaches und verläßliches Arbeiten, und die bis jetzt erhaltenen Resultate geben deutliche Hinweise auf die dabei einzuschlagenden Richtungen. Man muß einstweilen davon absehen, Vermutungen über die physiologische oder pharmakologische Bedeutung der erhobenen Befunde auszusprechen, obwohl die Erkennung eines ursächlichen Zusammenhanges mit den Allgemeinwirkungen des Lichtes und den Heilerfolgen von Lichtkuren natürlich das Ziel aller unserer Arbeiten ist. Es sind zur Zeit weitere Untersuchungen über das Methämoglobin-Hämoglobinsystem und das ihm unmittelbar verwandte Cytochromsystem bei uns im Gange. Vielleicht werden nach Abschluß dieser Arbeiten schon bessere Unterlagen für allgemeinere Betrachtungen vorliegen.

Zusammenfassung

1. Wird abgezogene frische Schweinehaut in geeigneter Anordnung von unten her mit einer methämoglobinhaltigen Blutlösung schaukelnd bespült und von oben her mit einer Quarzlampe bestrahlt, so reduziert sie das Methämoglobin zu Hämoglobin. Unbestrahlte Schweinehaut zeigt diese Fähigkeit in viel geringerem Maße.

2. Die Reduktionswirkung ist auch dann noch deutlich, wenn der kurzwellige Anteil der Quarzlampenstrahlung durch ein Filter abgeschnitten wird.

3. Läßt man vor dem Versuch Sulfhydrylgifte auf die Haut einwirken, so bleibt die beschriebene Reduktionswirkung aus.

4. Die Reduktion des Methämoglobins durch einfache Sulfhydrylkörper wie Cystein und Glutathion wird durch das Quarzlampenlicht beschleunigt.

5. Wird die methämoglobinhaltige Blutlösung allein (ohne darüberliegende Schweinehaut) bestrahlt, so ist keine Reduktionswirkung erkennbar.

6. Wird die Schweinehaut allein bestrahlt, so zeigt sie nicht nur während, sondern auch noch lange nach der Bestrahlung ein erhöhtes Reduktionsvermögen, das leicht durch die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes zum zugehörigen blauen Formazan erkannt werden kann. Auch gefiltertes Quarzlampenlicht hat diese Wirkung. Sie tritt besonders an abgelagerter Schweinehaut hervor, deren Sulfhydrylgruppen oxydiert und dadurch reduktionsunwirksam geworden sind.

7. Sowohl das Reduktionsvermögen frischer Haut als auch das durch Bestrahlung wiedererweckte Reduktionsvermögen abgelagerter Haut kann aus der Haut teilweise ausgewaschen werden und geht in das Waschwasser über. Das Waschwasser reduziert dann Methämoglobin zu Hämoglobin. Durch Sulfhydrylgifte wird das Reduktionsvermögen des Waschwassers aufgehoben.

Literatur

Betke, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus. Springer-Verlag 1954.

Bock, J.: Skandin. Arch. f. Physiol. **6**, 299 (1895). zit. n. Kobert, R.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **82**, 603 (1900).

Dalibor, H.: Inaug.-Dissertation Greifswald 1957. Atti del 2° Congresso Internationale Di Fotobiologia. Turin 1957.

Haldane, J.: J. Physiol. (Lond.) **15**, 230 (1900); zit. n. Leers, O.: Biochem. Z. **12**, 252 (1908).

Hasselbalch, K. A.: Biochem. Z. **19**, 435 (1909).

Hoppe-Seyler, F.: Medicin. Centralblatt Nr. 28 S. 433 (1863).

Leers, O.: Biochem. Z. **12**, 252 (1908).

Ortmann, P.: (1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **191**, 12 (1939).

Ortmann, P.: (2) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **192**, 96 (1939).

Ried, W., u. H. Gick: Justus Liebigs Ann. Chem. **581**, 16 (1953).

Urban, G.: (1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **199**, 345 (1942).

Urban, G.: (2) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **202**, 337 (1943).

Urban, G.: (3) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **203**, 306 (1944).

Walker, E.: (1) J. Physiol. (Lond.) **59**, 32 (1924).

Walker, E.: (2) Biochem. J. **19**, 1085 (1925).

Wels, P.: (1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **188**, 264 (1938).

Wels, P.: (2) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **171**, 480 (1933).

Wels, P.: (3) Klin. Wschr. **1939**, 589.

Dr. Inge Zlotowski, Pharmakologisches Institut der Universität Greifswald, Friedrich-Loeffler-Str. 23 d

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 544—547 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Medizinischen Akademie „Carl Gustav Carus", Dresden
(Direktor: Prof. Dr. W. Oelssner)

Ein Gerät zur Registrierung von Impulsfrequenzen

Von
Ch. Brehmer und K. Feller

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 5. September 1958)

Frequenzänderungen rhythmischer Vorgänge werden meist mit Hilfe sogenannter Ordinatenschreiber anschaulich registriert. Die bisher bekannt gewordenen Modelle lassen sich einteilen in:

1. Mechanisch-elektrische und
2. Elektrische Geräte.

Die erste Gruppe kann weiter gegliedert werden in Geräte, die

a) die anfallenden Impulse in einer variablen Zeiteinheit registrieren (Horita, Junkmann, Rothlin, Thorp);

b) die Zeit zwischen zwei Impulsen registrieren (Brecht, Druckrey u. Uhlig, Fleisch, Gaddum u. Kwiatkowski, Genuit u. Ruppert, Johnson, Jung u. Eisenmann, Lembeck, Scucs u. Balla).

Unter die zweite Hauptgruppe fallende elektrische Ordinatenschreiber wurden u. a. von Andrew u. Roberts, Cerletti, Haerdi u. Taeschler, Gross u. Häfelfinger, Kramer u. Chemnitius und Lullies beschrieben.

Da die verschiedenen Modelle nicht unseren Anforderungen entsprachen, entwickelten wir einen mechanisch-elektrischen Ordinatenschreiber, der unseren Erachtens bestimmte Vorteile gegenüber den uns bekannten Modellen besitzt[1]. Vom Bau eines elektrischen Ordinatenschreibers sahen wir ab, da der wesentlich größere Aufwand den Vorteil gegenüber einfacheren Geräten bisher nicht aufwiegt.

Beschreibung des Gerätes

Ein Hubmagnet (*2*) hebt pro Impuls eine Gewindestange (*9*), an welcher der Schlitten (*15*) mit der Schreibvorrichtung hängt, um 1 mm [2]. Während die Gewindestange nach jedem Impuls in ihre Ausgangsstellung zurückfällt, verhindert eine Sperrgewindestange (*11*) das Zurückfallen des Schlittens. Am Ende des festgelegten Zeitintervalles wird durch eine Schaltuhr über ein Speicherwerk (siehe unten) ein Drehmagnet (*4*) betätigt. Dieser klinkt den Schlitten aus der Sperr- und Hubgewindestange aus und drückt die federnd gelagerte Schreibspitze an die Registrierfläche, so daß er schreibend auf den Anschlag (*16*) zurückfällt. Dieser Vorgang

[1] Das Gerät wurde im Grundprinzip auf der 23. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Freiburg demonstriert (Feller).

[2] Eine variable Einstellung von 1, 2 oder 3 mm pro Hub, wie wir sie in unserer ersten Konstruktion verwendeten, hat sich als nicht nötig erwiesen.

wird durch eine Feder (*19*) beschleunigt. Die erforderliche Zeit zwischen Ausklinken, Abwärtsbewegung und Einklinken des Schlittens beträgt maximal 0,4 sec. Ein Speicherwerk fängt die in dieser Zeit anfallenden Impulse auf, wobei je nach Frequenz wahlweise 2 oder 5 Impulse gespeichert werden können. Das Speicherwerk steuert während seiner Tätigkeit folgende Funktionen des Ordinatenschreibers: Der erste Impuls nach Ablauf des Zeitintervalles bewirkt das Ausklinken des Schlittens. Der 2. bzw. 5. Impuls bringt diesen in die Hubstellung zurück, vom 3. bzw. 6. Impuls an wird der Schlitten wieder gehoben.

Als Schaltuhr verwendeten wir die gebräuchlichen Kontaktuhren mit Ankerwerk oder Synchronmotor und eine elektronische Uhr. Über die Problematik Zeitsystem und Frequenzregistrierung ist eine Arbeit in Vorbereitung.

Mit diesem Gerät kann sowohl die Impulszahl in einer beliebig einstellbaren Zeiteinheit als auch das zwischen zwei Impulsen liegende Intervall registriert werden. Im ersten Falle garantiert das Speicherwerk eine verlustlose Aufzeichnung auch höherer Frequenzen bis etwa 10 Hz. Die aufgezeichnete Ordinate ist direkt proportional der Impulsfrequenz. Die Impulszahl innerhalb des gewählten Zeitraumes entspricht der Ordinatenhöhe in Millimetern zuzüglich der 3 bzw. 4 im Speicherwerk verbliebenen Impulse. Im zweiten Falle — Registrierung des Intervalles zwischen zwei in größerem Zeitabstand aufeinanderfolgenden Impulsen — wird auf den Ordinatenschreiber eine konstante Frequenz gegeben. Der zu registrierende Vorgang unterbricht dann an Stelle der Schaltuhr die Aufwärtsbewegung des Schlittens. Das Speicherwerk bleibt dabei in Tätigkeit.

Besonders zur Frequenzregistrierung bei langsamer Drehung der Kymographiontrommel, wie sie in pharmakologischen Versuchen meist

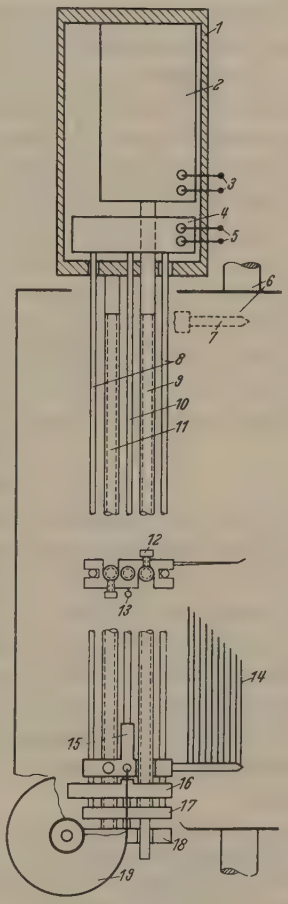


Abb. 1

1 Gehäuse, *2* Hubmagnet, *3* Stromanschluß-Hubmagnet, *4* Drehmagnet, *5* Stromanschluß-Drehmagnet, *6* Kymo-Trommel und Achse, *7* Höchste Stellung des Schreibschlittens, *8* Drehstangen des Drehmagneten, *9* Hubgewindestange, *10* Gleitstange für den Schreibschlitten, *11* Sperrgewindestange, *12* Sperrbolzen, federnd und *13* Öse für Rückholfaden (am Schreibschlitten), *14* Kurvenbild, *15* Schreibschlitten, *16* Verstellbarer Anschlag für den Nullpunkt, *17* Gegendrehlager, *18* Halter für Sperrgewindestange und Rückholfederrolle, Hubstangenlager, *19* Rückholfederrolle mit Faden

benötigt wird, hat sich der Ordinatenschreiber bewährt. Er ist klein und handlich und kann an jedes gebräuchliche Kymographion befestigt werden. Das Gerät schreibt nur bei der Abwärtsbewegung des Schlittens und erlaubt eine Aufzeichnung entgegen der Trommeldrehung. Andere rechts vom Kymographion anzubringende Registrierinstrumente werden in ihrer Funktion nicht gestört. Es können bei minimaler Verschiebung der Schreibspitze des Ordinatenschreibers sogar Kurven ineinander geschrieben werden. Die Abwärtsbewegung des Schreibschlittens wird durch eine Feder beschleunigt, so daß der Ordinatenschreiber auch bei waagerechter Lage des Kymographions oder vor dem waagerechten Schlitz des Photokymographions zu verwenden ist.

Das Gerät hat sich seit einem Jahr u. a. bei folgenden Verfahren bewährt: Registrierung der Herzfrequenz narkotisierter Katzen und Ratten und isoliert schlagender Warm- und Kaltblüterherzen, Registrierung ausströmender Flüssigkeiten über photoelektrischen Tropfenzähler oder mit der Wippe nach Kondon, z. B. Durchströmung menschlicher Placenten, Gefäßpräparate von Meerschweinchen usw., Coronardurchfluß am Langendorff-Herzen, Registrierung der Atemfrequenz.

Zusammenfassung

Es wird ein Ordinatenschreiber auf mechanisch-elektrischem Prinzip beschrieben, der sowohl die Impulszahl während eines stufenlos regelbaren Zeitraumes als auch die Zeitintervalle zwischen zwei Vorgängen linear und verlustlos registriert. Er ist klein und handlich, so daß er leicht an jedem Kymographion befestigt werden kann. Er kann so an das Kymographion gebracht werden, daß er platzmäßig gleichzeitig registrierende Instrumente nicht behindert. Durch diese Registrierung ist ein Ineinanderschreiben der Kurven möglich. Er ist auch am waagerechten Kymographion und vor dem Schlitz des Photokymographions zu verwenden.

Dem Mechanikermeister des Institutes, Herrn Legler, verdanken wir den Bau des Ordinatenschreibers.

Das Gerät kann von der Firma E. Zimmermann, Leipzig O 27, Wasserturmstr. 33, bezogen werden.

Literatur

Andrew, A. M., and T. D. M. Roberts: J. Physiol. (Lond.) **121**, 31 P (1953).

Brecht, K.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **249**, 236 (1947).

Cerletti, A., F. Haerdi u. M. Taeschler: Helv. physiol. pharmacol. Acta **9**, C 5 (1951).

Druckrey, H., u. H. Uhlig: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **198**, 74 (1941).

Feller, K.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 368 (1957).

Fleisch, A.: Neue Methoden zum Studium des Gasaustausches und der Lungenfunktion S. 63, 99. Leipzig: VEB Georg Thieme 1956.

Forst, A. W., u. K. Heuwing: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 349 (1953).
Gaddum, J. H., and I. Kwiatkowski: J. Physiol. (Lond.) **94**, 87 (1938).
Genuit, H., u. H. Ruppert: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **200**, 684 (1943).
Gross, F., u. Ch. Häfelfinger: Helv. physiol. pharmacol. Acta **9**, C 6 (1951).
Horita, A., and J. M. Dille: J. Lab. clin. Med. **41**, 166 (1953).
Johnson, S.: Acta physiol. scand. **10**, 342 (1945).
Jung, F., u. M. Eisenmann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **209**, 42 (1950).
Junkmann, K.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **120**, 314 (1924).
Kramer, H., u. K. Chemnitius: Z. ges. exp. Med. **129**, 577 (1958).
Lembeck, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 50 (1954).
Lullies, H.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **241**, 354 (1939).
Rothlin, E.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **176**, 635 (1914).
Thorp, R. H.: Brit. J. Pharmacol. **3**, 271 (1948).
Schaefer, H., E. Bleicher u. F. Eckervogt: Pflügers Arch. ges. Physiol. **251**, 491 (1949).
Scuos, E., u. L. Balla: Acta physiol. (Budapest) **11**, 309 (1956).

Dr. med. K. Feller,
Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Dresden,
Dresden A 1, Lingnerplatz 1

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 548—565 (1958)

Aus dem pharmakologischen Institut der medizinischen Universität, Pécs, Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. J. Méhes)

Selektive chemische Ausschaltung der Harnkanälchen I. Ordnung bei Kaninchen

Von

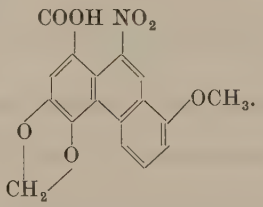
J. Méhes, L. Decsi, F. Varga und S. Kovács

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. August 1958)

Wir haben schon früher darauf hingewiesen (Méhes, Decsi, Kovács, Varga u. Szőke), daß die Aristolochiasäure eine selektive, nur die proximalen gewundenen Harnkanälchen treffende Epithelzellnekrose in der Kaninchenniere hervorruft, ohne irgendwelche Schädigung anderer Nierenteile oder anderer Organe. Da ein, mit Aristolochiasäure vergiftetes Kaninchen kaum über intakte Zellen in den Kanälchen I. Ordnung verfügt, schien es uns angebracht, einige funktionelle Untersuchungen über die Nierentätigkeit solcher Tiere durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wollen wir über diese Untersuchungen berichten. Eine vorläufige Mitteilung über einen Teil dieser Versuche erschien in der Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. (Decsi, Méhes u. Varga).

Die aus den Wurzeln von Osterluzei (*Aristolochia clematitis*) isolierte Aristolochiasäure ist ein gelber, kristallierter Stoff, mit der Bruttoformel $C_{17}H_{11}O_7N$. Die chemische Struktur soll nach Pailer u. Mitarb. wahrscheinlich die folgende sein:



Es ist eine interessante Eigentümlichkeit des Stoffes, daß er — neben Chloromycetin — die zweite bisher bekannte organische Nitroverbindung pflanzlicher Herkunft darstellt (Pailer u. Mitarb.). Die Isolierung und Reinigung des Stoffes werden am Ende dieser Mitteilung besprochen.

Methodischer Teil

A. Nierenfunktionsprüfungen an Kaninchen

Die Messung des Glomerulusfiltrats geschah an nicht-narkotisierten Kaninchen, nach dem Prinzip der sogenannten Einzelinjektionsclearance. Als Clearance-Stoff wurden Kreatinin, Na-thiosulfat und Inulin verwendet. In den ersten Versuchen

wurde das Glomerulusfiltrat parallel mit den drei genannten Stoffen ermittelt, später haben wir nur Thiosulfat und Kreatinin, oder Kreatinin allein verwendet, da alle drei Clearancestoffe miteinander gut übereinstimmende Werte geliefert haben. Das Verfahren war das folgende:

Die 12 Std lang hungernden Kaninchen erhielten 100 ml (pro toto) Wasser per os, und gleichzeitig 100 mg/kg Kreatinin, 500 mg/kg Na-thiosulfat und 400 mg/kg Inulin i.m. Vor der Verabreichung dieser Stoffe wurde dem Tier Blut und Harn entnommen, welche die Leerwerte für die chemischen Bestimmungen lieferten. (Wurde ein Tier nur mit Kreatinin behandelt, so kann dieser Leerwert — welcher im allgemeinen um 0,5—1,5 mg-% beträgt — als unnötig, weggelassen werden.) Eine Stunde nach der Verabreichung des Clearancestoffes wurde die Harnblase mit leichtem Handdruck auf die Bauchwand entleert und das Tier in einen Stoffwechselkäfig gesetzt. 60—80 min nachher wurde aus der V. jugularis Blut entnommen, und nach einer Zeit — die genau gleich mit dem Zeitraum von Beginn der Harnsammlung bis zur Blutentnahme war — die Harnblase wieder entleert. Aus der Analyse des während der Clearanceperiode gesammelten Harns und des in der Mitte der Periode entnommenen Blutes wurde dann das Glomerulusfiltrat in der üblichen Weise berechnet.

Die verwendeten Clearancestoffe verteilen sich im Körper schon 1 Std nach der i.m.-Injektion gleichmäßig und der Plasmaspiegel zeigt sowohl nach unseren Erfahrungen wie auch nach den Literaturangaben (Spühler) ein gleichförmiges Absinken. Der durchschnittliche Plasmaspiegel der Clearancestoffe war bei Normaltieren 9,8 mg-% (4—15 mg-%) für Kreatinin, 27 mg-% (14—44 mg-%) für Inulin und 39 mg-% (12—59 mg-%) für Thiosulfat.

Die beschriebene Methode gestattet eine gut reproduzierbare Ermittlung der Menge des Glomerulusfiltrats an nicht-narkotisierten Tieren, unter Vermeidung der bei den Kaninchen sonst sehr leicht auftretenden reflexogenen Ischämie der Nierenrinde (Brod u. Sirota; Forster).

An narkotisierten Kaninchen mit Infusionstechnik konnten wir — im Gegensatz zu den Hunden — kein befriedigendes Ergebnis erreichen.

Die Messung der maximalen tubulären p-Aminohippursäure-Ausscheidung (Tm_{PAH}). Die Tiere erhielten gleichzeitig mit den Clearancestoffen 600 mg/kg PAH i.m. (neutralisiert mit $NaHCO_3$). Die Messung erfolgte nach den gleichen Grundsätzen, wie jene des Glomerulusfiltrats. Das *Tm*-Wert wurde aus der Differenz der in den Glomeruli filtrierten und der mit Harn ausgeschiedenen PAH-Mengen ermittelt. Die durchschnittlichen Plasmaspiegel von PAH ergaben in der Mitte der Periode 50—60 mg-% und am Ende des Versuchs ungefähr 30 mg-%.

Die Messung der tubulären Phenolrot-Ausscheidung. Die Tiere wurden mit 100 ml Wasser per os aufgefüllt. Eine Stunde nachher erhielten sie 5 mg (pro toto) Phenolrot i.v., und von diesem Zeitpunkt ab wird der Harn während 3 Std gesammelt und die Harnmenge und die Phenolrotkonzentration im Harn gemessen. Bei normalen Kaninchen können 92—98% des verabreichten Farbstoffes in dem während 3 Std ausgeschiedenen Harn wiedergefunden werden. Auch diese Tatsache beweist, daß *die Harnblase durch die oben beschriebene Harnsammlungsmethode quantitativ entleert werden kann.*

Messung der antidiuretischen Hormonwirkung. Den Tieren wurde 100 ml Wasser per os gegeben, und die Menge, sowie der Gefrierpunkt des innerhalb 2 Std gesammelten Harnes gemessen. Eine Gruppe der Tiere wurde gleichzeitig mit der Wassergabe mit 1 IE Hypophysenhinterlappenhormon s.c. behandelt. (Wir haben das Präparat „Glanduitrin" der Firma Chinoin verwendet.) Dieselben Versuche wurden dann auch nach Aristolochiasäure-Vergiftung durchgeführt: dazu wurden teilweise die auf ADH-Wirkung vorher schon untersuchten Tiere, aber auch neue Kaninchen verwendet.

Messung der maximalen tubulären Zuckerresorption. Die für Clearance-Untersuchung vorbereiteten, d. h. gewässerten und mit Kreatinin behandelten Tiere erhielten am Beginn der Harnsammlungsperiode 5 g/kg Glucose i.v. (in einer 50%igen Lösung). Dann wurde das Tier in den Stoffwechselkäfig gesetzt und nach 15, höchstens 20 min aus der V. jugularis für Kreatinin- und Glucosebestimmung Blut entnommen. Nach Ablauf eines gleichen Zeitraumes wurde die Blase entleert. (Längere Perioden können nicht verwendet werden, da der Blutzuckerspiegel am Ende des Versuches auf zu niedrige Werte, unter 300 mg-% sinkt.) In unseren Versuchen war der durchschnittliche Blutzuckerspiegel in der Mitte der Periode 595 mg-% und am Ende der Periode um 400 mg-%.

Der Blutzuckerspiegel zeigt nach i.v. Darreichung von Glucose ein ebenso gleichmäßiges Absinken, wie der Blutspiegel der allgemein verwendeten Clearancestoffe (Decsi). Die Messung erfolgt demnach auf Analogie der Bestimmung des Glomerulusfiltrats nach dem Eininjektionsclearance-Verfahren.

B. Biochemische Methoden

Bestimmung der Bernsteinsäuredehydrogenaseaktivität. Aus den Kaninchennieren wurden wäßrige Homogenate gefertigt und ihre Bersteinsäuredehydrogenaseaktivität nach der Methode von Kun u. Abood bestimmt.

Saure Phosphataseaktivität. Medium: 0,05 M Acetatpuffer (p_H 4,7), 0,02 M Na-β-Glycerophosphat, und 50 mg Nierengewebe (als 10%iges dest. wäßriges Homogenat). Gesamtvolumen 5 ml, Inkubationszeit 60 min bei einer Temperatur von 38° C. Enteiweißung mit 3 ml 20%iger Trichloressigsäure.

Alkalische Phosphataseaktivität. Medium: 0,06 M $MgCl_2$, 0,06 M Veronal-HCl-Puffer (p_H 9,6), 0,02 M Na-β-Glycerophosphat und 50 mg Nierengewebe. Inkubierung des Präparates während 30 min, Enteiweißung wie oben.

C. Histologische Methoden

Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten wurden aus Formol-fixierten Organen der eingegangenen oder durch Nackenschlag getöteten Tiere in der üblichen Weise hergestellt.

Die Ausführung der Benzidinreaktion erfolgte an Gefrierschnitten.

Die Phosphataseaktivitäten wurden nach der Methode von Gömöri entweder an Gefrierschnitten, oder nach Fixierung im Aceton durchgeführt.

Nachweis einer etwaigen Kalkablagerung erfolgte nach Kóssa.

D. Chemische Methoden

Die im Laufe der Untersuchungen verwendeten chemischen Bestimmungsmethoden waren die folgenden: Kreatinin nach Popper, Mandel u. Máyer; Thiosulfat nach Klupp u. Watschinger; Inulin nach Miller u. Mitarb.; p-Aminohippursäure nach Kedvessy; Phenolrot nach Sheehan; Glucose nach Nelson; Carbamid nach Folin u. Bell; Serumeiweiß nach Kjeldahl; RN nach Láng; anorganisches Phosphat nach Fiske u. Subbarow; Chlorid nach der von Ruszнyák modifizierten Volhardschen Methode. Zum qualitativen Nachweis von Zucker im Harn dienten die Proben von Nylander, Fehling u. Bertrand. Die Messung der Gefrierpunktserniedrigung des Harns erfolgte mit einem Mikro-Beckmann Apparat.

Der Wassergehalt der Nieren wurde aus der Differenz des Feuchtgewichtes und des, durch 8 Std langes Trocknen des Gewebes bei 105° C gewonnenen Trockengewichtes bestimmt.

E. Löslichkeit der Aristolochiasäure

Aristolochiasäure löst sich auch im heißen Wasser nur wenig, die Löslichkeit ihres Na-Salzes ist besser. Im allgemeinen haben wir eine 0,1%ige wäßrige Lösung der Aristolochiasäure verwendet, die durch Neutralisierung des Stoffes mit $NaHCO_3$ bei 80—90° C hergestellt wurde. Aus dieser Lösung fällt die Aristolochiasäure auch nach Abkühlung nicht aus.

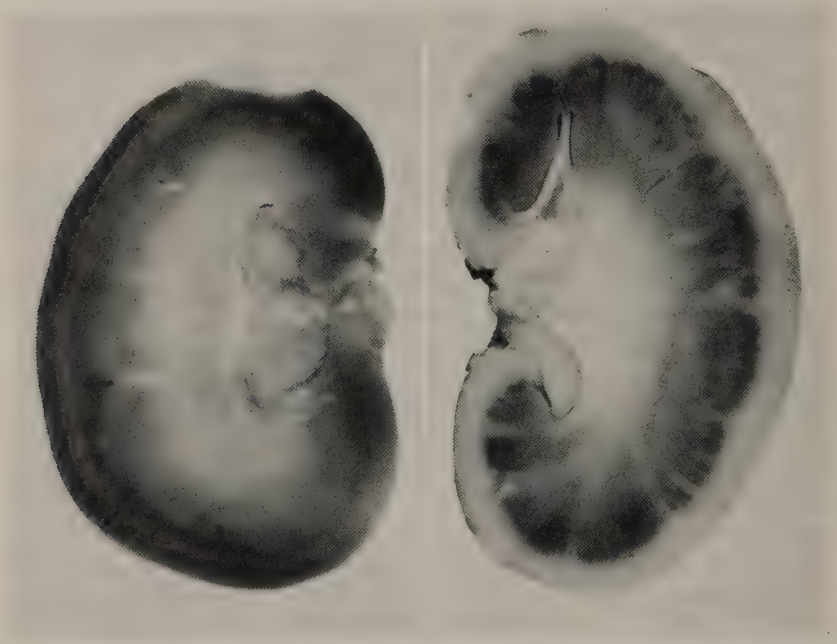
Versuchsergebnisse

A. Verlauf der Aristolochiasäure-Vergiftung

Wird einem Kaninchen 1 mg/kg Aristolochiasäure i.v. verabreicht, so geht das Tier innerhalb 6—7 Tagen ein. Nach der Vergiftung beobachteten wir Appetitlosigkeit und Schläfrigkeit, die Tiere sind entkräftet, ihre Motilität ist stark vermindert. Am 2. Tag erscheint Eiweiß im Harn, in den weiteren Tagen in einer beträchtlichen Menge. Das Eiweiß, welches sich im Harn befindet, stammt — wenigstens teilweise — aus den zugrundegehenden Tubulusepithelzellen. Dies konnte dadurch bewiesen werden, daß es uns gelang, eine alkalische Phosphataseaktivität im Harn vergifteter Kaninchen nachzuweisen, und zwar nach 24 stundenlangem Dialysieren des Harnes gegen destilliertem Wasser bei + 4° C. Im Harn normaler Kaninchen konnten wir alkalische Phosphatase niemals finden, was mit den diesbezüglichen Beobachtungen von Horii u. Mitarb. im Einklang steht. Im Harn sind Hyalin- und Epithelzylinder zu sehen, am Ende der Vergiftung auch Erythrocyten. *Zucker konnte im Harn niemals nachgewiesen werden.* Die in den ersten 24 Std gesammelte Harnmenge liegt etwas höher als die Kontrollwerte, später nimmt sie wenig ab. Eine Anurie tritt aber niemals auf, die Diurese ist auch im Endstadium der Vergiftung relativ gut erhalten. Die in 24 Std ausgeschiedene Chlormenge ist etwas kleiner als bei den Kontrollen. Der Rest-N-Spiegel ist schon am 2. Tage erheblich erhöht, praemortal finden sich Werte von ungefähr 300 mg-%. Auch der Kreatininspiegel nimmt im Serum erheblich zu (bis 18—25 mg-%). Der Chlor- und Eiweißgehalt des Blutes, der Blutzuckerspiegel, der Zahl der roten und weißen Blutzellen, sowie das Hämatokritwert ändern sich im Laufe der Vergiftung nicht.

Der merkwürdigste Befund bei den durch Aristolochiasäure-Vergiftung eingegangenen Kaninchen ist eine, auch makroskopisch gut sichtbare, äußerst hochgradige Nierenrindenischaemie (Abb. 1). Die Nieren sind stark geschwollen: das Nierengewicht ist 8,34 g/kg Tier, während dieser Wert bei normalen Kaninchen nur 6,06 g/kg Tier beträgt. Der Wassergehalt der Nierenrinde nimmt bedeutend zu: während bei normalen Tieren das Trockengewicht der Nierenrinde 21,5% des Feuchtgewichts darstellt, sinkt dieser Wert bei vergifteten Kaninchen (am 4. Tage) auf 13,9% ab.

Die Rindenischämie, wie auch die später zu besprechende Epithelnekrose der Tubuli kann durch vorherige Nierendenervierung, Splanchnicusdurchschneidung und durch Entfernung des abdominolumbalen sympathischen Grenzstranges nicht verhindert werden. (Die Vergiftung



a b

Abb. 1. Kaninchennieren. a Normale; b 48 Std nach 1 mg/kg Aristolochiasäure

mit Aristolochiasäure erfolgte im allgemeinen 10—12 Tage nach den obenen Eingriffen.) Auch Behandlung mit einem Adrenolyticum (0,1 mg/kg Hydergin zweimal täglich während 8 Tage: Aristolochiasäure am 4. Tage gegeben) führte zu keiner Schutzwirkung.

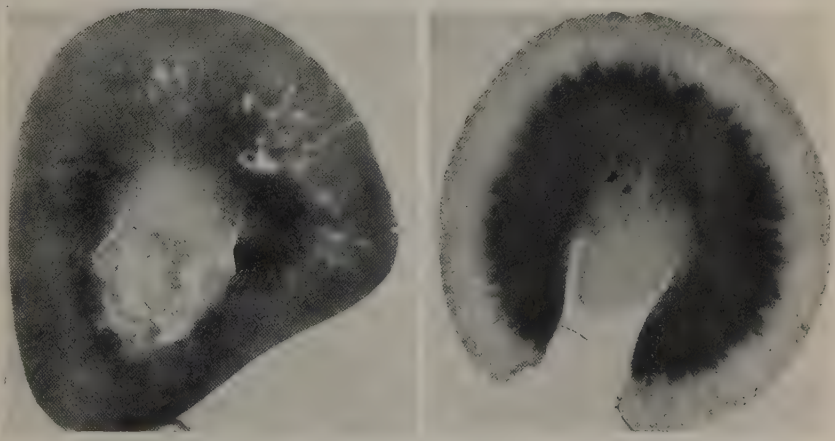
B. Histologische Befunde[1]

Kaninchenniere. Nach Verabreichung von 1 mg/kg Aristolochiasäure i.v., beginnt die alkalische Phosphataseaktivität im Bürstensaum der Kanälchen I. Ordnung schon 4—5 Std nach der Verabreichung des Stoffes stark an Intensität abzunehmen. Später ist die alkalische Phosphataseaktivität nahezu völlig verschwunden; eine geringe Fermentaktivität bleibt nur in der Pars recta medullaris erhalten (Abb. 3). Oft kann auch in

[1] Die Auswertung der histologischen Befunde wurde von Herrn Prof. Dr. G. Romhányi (Pathologisches-Anatomisches Institut der medizinischen Universität, Pécs) durchgeführt. Für seine wertvolle Hilfe sind wir zu besonderem Dank verpflichtet.

den, im Tubuluslumen sich befindlichen Epithelzellbrüchen alkalische Phosphataseaktivität beobachtet werden (Kalkfärbung nach Kóssa ist negativ).

Die andere, relativ früh erscheinende Veränderung ist die nach 16 bis 20 Std auftretende, vorher geschilderte Rindenischämie. In diesem Zeitpunkt ist die intermediäre Zone auffallend mit Blut erfüllt. An Schnitten,



a b

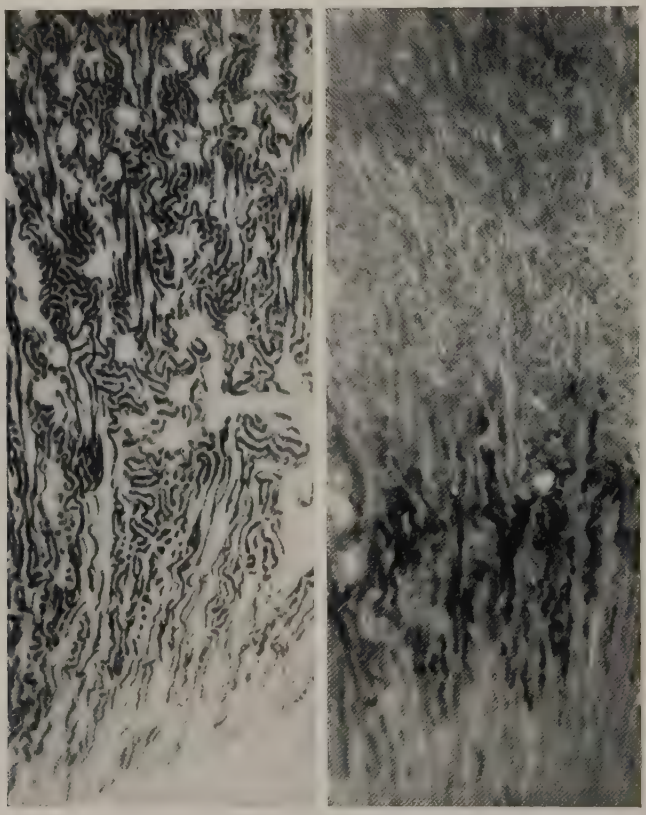
Abb. 2. Benzidinreaktion. a Normales Kaninchen; b 36 Std nach 1 mg/kg Aristolochiasäure

die mit Benzidin behandelt wurden, befinden sich sehr viele vollkommen blutleere Glomeruli. Es gibt Gebiete, wo auch Capillaren nicht zu sehen sind (Abb. 2).

An Hämatoxylin-Eosin-Schnitten (Abb. 4) sind die Frühzeichen der Vergiftung: grobkörnige Veränderungen in den Epithelzellen, pyknotische Kerne, später stellenweise das Ausbleiben der Kernfärbung, und eosinophile Infiltrationen in den Kanälchen I. Ordnung. Am 2.—3. Tage ausgedehnte, meistens *vollkommene Nekrosen in den Kanälchen I. Ordnung*. Diese Nekrosen grenzen sich von dem diastalen Teil der Pars recta medullaris scharf ab. Im Lumen der Kanälchen sind nekrotisierte Epithelzellen und viele Cylinder zu finden. Die Henleschen Schleifen sind erhalten und ebenso wenig kann irgendeine Schädigung oder Veränderung in den Epithelzellen der Kanälchen II. Ordnung beobachtet werden. Die Glomeruli sind unverletzt, kein Zeichen für eine Entzündung oder eine Schädigung. Die Bowmannsche Kapsel ist leer, keine seröse Veränderung. In der Rinde eine Reihe von erweiterten Venen, mit einem plasmatischen-serösen Inhalt.

Die oben erwähnten histologischen Veränderungen können in leichterem Ausmaß auch nach kleineren Gaben von Aristolochiasäure (0,1 bis

0,2 mg/kg) beobachtet werden. Die Epithelveränderungen sind — obwohl in viel beschränkterem Maße — auch in diesen Fällen nachweisbar: die alleinige qualitative Abweichung ist das Fehlen der Rindenischämie. Überlebten die Tiere diese kleineren Dosen 8—10 Tage, so konnten wir in



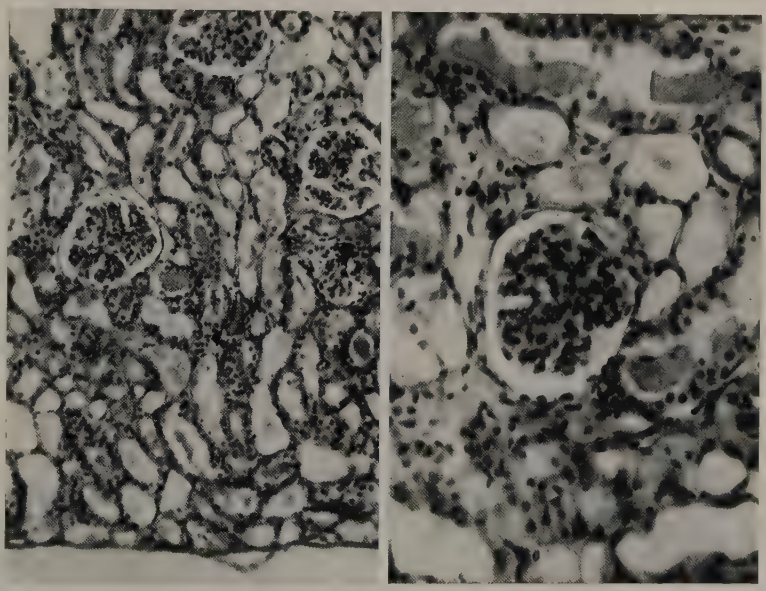
a b

Abb. 3. Alkalische Phosphataseaktivität. a Normale Niere; b 72 Std nach 1 mg/kg Aristolochiasäure

einigen Fällen an Stelle der zerstörten Epithelzellen des Hauptstückes eine flache, aspezifische indifferente Epithelzellschicht von regenerativem Charakter nachweisen, welche eine sehr starke Kernfärbung zeigte.

Ähnliche Veränderungen hat Martinčić in den Nieren von *Pferden* gefunden, die zufällig mit osterluzeihaltigem Heu vergiftet wurden. Seiner Meinung nach ist in den meisten Fällen ein flaches Epithel von regenerativem Charakter in den Nierenkanälchen der Pferde nachweisbar: die Veränderung ist so spezifisch, daß sie auch eine diagnostische Bedeutung für die Erkennung einer Vergiftung mit Aristolochia-haltigem Heu hat.

Wurde 1—30 mg/kg Aristolochiasäure an *Fröschen, Meerschweinchen, Hunden oder Katzen* i.v., i.m. oder i.p. verabreicht, konnten wir keine histologisch nachweisbare Veränderung in den Nieren weder durch einmalige Gabe, noch durch mehrtägliche Behandlung auslösen. (Die histologischen Untersuchungen erfolgten 1, 2 und 4 Tage nach der letzteren Gifteinspritzung, an mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten; mit Benzidin behandelten und für Nachweis alkalischer Phosphataseaktivität vorbereiteten Nierenschnitten.)



a b

Abb. 4. Hämatoxylin-Eosin Färbung. a 72 Std nach 1 mg/kg Aristolochiasäure. Fortgeschrittene, stellenweise völlige Epithelnekrose im Hauptstück. Andere Teile des Nephrons unverletzt; b Dasselbe Bild, stärkere Vergrößerung. Viele Zylinder in den Kanälchen II. Ordnung

Bei *Mäusen* konnten wir nach i.v. Verabreichung von 1 mg/kg Aristolochiasäure keine Veränderungen in den Nieren nachweisen. Nach 10 mg/kg Aristolochiasäure haben wir interstitielle Infiltration, großzellige Reaktion, lymphoide Zellen, aber kein Zeichen einer Nekrose gefunden. Wurde dagegen den Mäusen 30 mg/kg Aristolochiasäure gegeben, so konnte eine schwere Nekrose in der Pars recta medullaris gefunden werden.

Bei *Ratten* sind nach 30 mg/kg Aristolochiasaure i.v. ausgedehnte Nekrosen in den Kanälchen erster Ordnung und in der Pars recta medullaris zu sehen. Sehr viele Cylinder, welche die Henleschen Schleifen nahezu völlig verstopfen. Veränderungen von sehr leichter Natur sind auch

nach 20 mg/kg. Aristolochiasäure nachweisbar, während kleinere Gaben unwirksam sind.

An anderen Organen fanden wir weder bei Mäusen, noch bei Ratten, keine histologisch nachweisbare pathologische Änderungen.

Sehr interessant ist die Wirkung der Aristolochiasäure auf *Hunde*. In den Nieren, wie schon erwähnt, fanden wir keine pathologische Veränderung. Nach sehr großen Gaben (intravenöse Infusion von 50—100 mg/kg Aristolochiasäure an nicht narkotisierten Tieren) gingen die Hunde innerhalb 5—12 Std ein. Bei der Sektion fanden wie eine außerordentlich hyperämische, entzündlich geschwollene Schleimhaut mit oberflächlichem fibrinösem Belag. Die Entzündung beginnt mit einer scharfen Linie unter der Papilla *Vateri*, und dehnt sich meistens bis zum Anus aus. Diese Darmentzündung bei Hunden wurde auch schon von Pohl beobachtet.

An anderen Organen konnte auch bei Hunden keine histologisch nachweisbare Veränderung gefunden werden.

Die für die Hunde charakteristische Darmveränderungen nach Aristolochiasäure kommen nicht zustande, wenn der Abfluß der Galle in den Darmkanal verhindert wird (Unterbindung des Ductus Choledochus und Anlage einer Gallenblasenfistel). Eine ausführliche Darstellung dieser Beobachtungen wird in einer späteren Mitteilung gegeben.

C. Funktionsprüfungen

1. Glomerulusfiltrat. Die Menge des Glomerulusfiltrats beträgt bei normalen Kaninchen 4,37 $\pm$ 0,22 ml/kg/min. Diese sinkt 24 Std nach i.v. Gabe von 1 mg/kg Aristolochiasäure um 75% ab. Diese Abnahme des Glomerulusfiltrats fällt zeitlich mit dem Auftreten der Rindenischämie zusammen, wodurch jene befriedigend erklärt werden kann. Am 3. bis 5. Tage nimmt das Glomerulusfiltrat weiter ab (Tab. 1). Kleinere Gaben von Aristolochiasäure beeinflussen das Glomerulusfiltrat nicht.

2. Diurese und tubuläre Rückresorption von Wasser. Trotz der großen Abnahme des Glomerulusfiltrats, sinkt die Diurese der vergifteten Kaninchen nur wenig. Ein gesundes Tier produziert nach peroraler Gabe von 100 ml Wasser 0,15 ml/kg Harn pro Minute. 1 Std nach Aristolochiasäure (1 mg/kg) fanden wir 0,30 ml/kg Harn pro Minute, nach 24—48 Std 0,12 ml, und auch nach 3—5 Tagen noch 0,09 ml/kg pro Minute (Tab. 1). Diese Werte sind aus den Ergebnissen der Clearanceuntersuchungen entnommen; Zeitdauer der Harnsammlung 120—200 min. Die relative Stabilität der Diuresewerte — trotz der beträchtlichen Abnahme des Glomerulusfiltrats — kann nur in dem Falle bestehen, wenn gleichzeitig auch die tubuläre Wasserrückresorption infolge der Vergiftung sinkt. Darum haben wir berechnet, wieviel Prozent des in den Glomeruli filtrierten Wassers in den Tubuli wieder resorbiert wird. Wie es Tab. 1 zeigt,

resorbieren die Nierenkanälchen eines normalen Kaninchens nach peroraler Gabe von 100 ml Wasser 96,9% des Glomerulusfiltrats. Dieser Wert nimmt eine Stunde nach Aristolochiasäure auf 93,6 und später auf 81,8% ab.

Nach 0,1 mg/kg Aristolochiasäure i.v. resorbieren die Tubuluszellen 95,3% des Glomerulusfiltrats, und nach 0,2 mg/kg Aristolochiasäure 91,3%. (Untersucht am 3. Tage der Vergiftung.)

Tabelle 1. *Glomerulusfiltrat. Diurese und tubuläre Rückresorption von Wasser bei den mit Aristolochiasäure vergifteten Kaninchen*

	Kontrolle	1 Stunden nach 1 mg/kg Aristolochiasäure	24—48	72—120
Menge des Glomerulusfiltrats ml/kg/min	4,37 ± 0,22 (44)	3,59 ± 0,35 (7)	1,05 ± 0,75 (13)	0,34 ± 0,15 (10)
Harnmenge ml/kg/min	0,147 ± 0,009 (44)	0,304 ± 0,013 (7)	0,124 ± 0,009 (13)	0,086 ± 0,009 (10)
Rückresorption von Wasser als Prozent der filtrierten Wassermenge	96,9 ± 1,77 (44)	93,6 ± 2,5 (7)	82,5 ± 6,1 (13)	81,8 ± 4,0 (10)

In Klammern: Zahl der Versuche.

Auffallenderweise bleiben also nach 1 mg/kg Aristolochiasäure ungefähr 80% der tubulären Wasserrückresorption erhalten. Wie bekannt, sind 80% des in den Glomeruli filtrierten Wassers der sogenannten obligaten Wasserresorption unterworfen und nur über 20% kann der Organismus mit Hilfe der fakultativen Rückresorption durch das antidiuretische Hormon frei verfügen. Die zahlenmäßige Übereinstimmung der Werte für die fakultative Wasserresorption und für die nach Aristolochiasäure-Vergiftung zurückbleibende Wasserresorption brachte den Gedanken nahe, daß die Abnahme der Wasserresorption nach Vergiftung vielleicht durch den Ausfall der antidiuretischen Hormonwirkung zustande kommt. So untersuchten wir, wie die vergifteten Kaninchen auf exogenes antidiuretisches Hormon reagieren.

3. Wirkung des Hypophysenhinterlappenhormons. Nach einer peroralen Gabe von 100 ml Wasser scheidet ein normales Kaninchen innerhalb 2 Std 26,5 ml Harn aus, mit einem Gefrierpunkt von —0,81° C. Wird dem Tier gleichzeitig mit dem Wasser 1 I.E. HHL-Hormon (*Glanduitrin*) verabreicht, so sinkt die Harnmenge ungefähr auf 7 ml ab, mit gleichzeitiger Zunahme der Gefrierpunktserniedrigung auf —2,9° C. An Kaninchen, die mit Aristolochiasäure vergiftet wurden, beeinflußt dagegen

Glanduitrin weder die Harnmenge noch den Gefrierpunkt. Nach Zerstörung des Hauptstückes bleibt also die Wirkung des exogenen antidiuretischen Hormons auf die Niere völlig aus (Tab. 2). Es kann mit Recht angenommen werden, daß bei solchen Tieren auch das endogene antidiuretische Hormon ohne Wirkung ist, worauf wir schon oben hingewiesen haben.

Tabelle 2

Wirkung des antidiuretischen Hormons auf normale und vergiftete Kaninchen

	Normale Tiere		Vergiftete Tiere	
	ohne	mit	ohne	mit
	1 IE Glanduitrin		1 IE Glanduitrin	
Harnmenge, ml in 2 Std	$26{,}5 \pm 3{,}06$ (12)	$7{,}2 \pm 0{,}50$ (12) $-72{,}8\%$ $P < 0{,}001$	$26{,}5 \pm 2{,}64$ (12)	$25{,}5 \pm 2{,}98$ (12) $-3{,}8\%$ $P > 0{,}50$
Gefrierpunkt °C	$-0{,}81 \pm 0{,}01$	$-2{,}82 \pm 0{,}05$ $+248\%$ $P < 0{,}001$	$-0{,}78 \pm 0{,}05$	$-0{,}93 \pm 0{,}09$ $+19{,}3\%$ $P > 0{,}20$

In Klammern: Zahl der Versuche.

Auch nach einer kleineren Aristolochiasäure-Gabe (0,2 mg/kg), welche noch zu keiner Rindenischämie führt, doch in den Kanälchen schon histologische Änderungen hervorruft, kann eine leichtere Abnahme in der antidiuretischen Hormonwirkung beobachtet werden.

4. Phenolrot und PAH-Ausscheidung. Es ist allgemein anerkannt, daß diese Stoffe durch die proximalen Kanälchenzellen ausgeschieden werden. Wie es aus der Tab. 3 hervorgeht, zeigt die Tm_{PAH} 48 Std nach Vergiftung eine 60%ige Abnahme und wird am 4. Tage praktisch gleich Null. Ebenso, wie PAH, verhält sich auch die Phenolrotausscheidung (Tab. 3).

Auch nach 0,2 mg/kg Aristolochiasäure kann eine Abnahme der Tm_{PAH} nachgewiesen werden: der Wert sinkt von 2,38 mg/kg/min (Normaltiere) bis 1,62 mg/kg/min ab (72—96 Std nach der Vergiftung). 0,1 mg/kg Aristolochiasäure läßt die Tm_{PAH} unverändert.

Diese Angaben geben einen direkten Beweis dafür, daß die PAH- und Phenolrotausscheidung, lediglich bei den Kaninchen, ausschließlich nur durch die proximalen Kanälchenzellen geleistet wird.

5. Resorption von Glucose. Im Laufe der Untersuchungen war es eine der am meisten unerwarteten Beobachtungen, daß eine Glykosurie bei den vergifteten Tieren niemals nachgewiesen werden konnte. Auch in dem Endstadium der Vergiftung, — wenn die PAH und Phenolrotausscheidung völlig eingestellt war, — fanden wir niemals Zucker im Harn. *Wurden dagegen den vergifteten Kaninchen Phloridzin verabreicht*

(150 mg/kg i.m.) so reagierten die Tiere ebenfalls mit einer hochgradigen Glykosurie, wie die Normaltiere. Dies zeigt eindeutig, daß eine aktive Zuckerresorption in der Kaninchenniere auch nach Zerstörung der proximalen Kanälchenzellen stattfindet. Um dieser Frage näher zu kommen, haben wir die maximale Zuckerresorptionsfähigkeit *(Tm-Glucose)* normaler und vergifteter Kaninchen verglichen.

Tabelle 3. *Ausscheidung von Phenolrot und p-Aminohippursäure nach Aristolochiasäure-Vergiftung*

	Kontrolle	24	48	72	96
		Stunden nach 1 mg/kg Aristolochiasäure i.v.			
Phenolrot-Ausscheidung in Prozent	94,6 ± 1,2 (6)	61,7 ± 4,5 (13) − 34,3% $P < 0{,}01$	28,8 ± 2,4 (3) − 69,5% $P < 0{,}001$	6,8 ± 2,1 (6) − 93% $P < 0{,}001$	4,7 ± 2,1 (3) − 95% $P < 0{,}001$
Tm_{PAH} mg/kg/min	2,38 ± 0,04 (12)	1,67 ± 0,07 (6) − 30% $P < 0{,}02$	1,02 ± 0,08 (8) − 57,2% $P < 0{,}01$		0,15 ± 0,08 (4) − 94% $P < 0{,}001$

In Klammern: Zahl der Versuche.

Die Ausführung dieser Untersuchungen wurde aber durch die Tatsache erheblich erschwert, daß die Zuckerresorptionsfähigkeit der Kaninchenniere keine ständige obere Grenze zeigt. Die Menge der in den Tubuli rückresorbierten Glucose hängt nämlich — bei gleichzeitig bestehender Glykosurie — von der, in den Glomeruli filtrierten Zuckermengen ab, wie es einer von uns (Decsi) früher nachgewiesen hat. Danach ist die Lage bei den Kaninchen die folgende: je mehr Glucose im Glumerulusfiltrat ausgeschieden, desto mehr Glucose durch die Tubuli aufgenommen wird, obwohl das Tier im Harn Zucker ausscheidet (Tab. 4). Die tubuläre Zuckerrückresorption nimmt mit der Erhöhung der Menge der filtrierten Glucose nicht nur im absoluten Maße zu, sondern auch in dem Sinne, daß es im Falle eines größeren Zuckerfiltrats ein höherer Prozentsatz der filtrierten Glucose in den Tubuli zur Resorption kommt. Der Zusammenhang der in Glomeruli filtrierten und in Tubuli rückresorbierten Glucosemengen kann durch die folgende Gleichung wiedergegeben werden:

$$\log Tm = 1{,}57 \cdot \log F - 1{,}255$$

(wo Tm = resorbierte Glucose mg/kg/min und
F = die in der Glomeruli filtrierte Glucose mg/kg/min).

Die *Tm*[1]*-Glucose* kann also bereits aus der filtrierten Glucosemenge, ohne direkte Bestimmung der Zuckerresorption, berechnet werden.

[1] *Tm* bedeutet hier nicht die für die *Tierart* charakteristische maximale Resorptionsfähigkeit, sondern die Menge der in dem gegebenen Falle resorbierten Glucose.

Unter Berücksichtigung des Obengesagten wurde die „maximale" Zuckerresorptionsfähigkeit normaler und vergifteter Kaninchen ermittelt. Da bei den vergifteten Kaninchen, infolge des kleineren Glomerulus-

Tabelle 4. *„Maximale" tubuläre Rückresorption von Glucose in normalen und vergifteten Kaninchen*

Kontrolltiere		Vergiftete Tiere	
Filtrierte Glucose mg/kg/min	Resorbierte Glucose mg/kg/min	Filtrierte Glucose mg/kg/min	Resorbierte Glucose mg/kg/min
17,6	4,96 (5)	18,4	5,10 (8)
24,1	7,96 (8)	22,9	8,52 (6)
34,2	16,2 (6)	36,2	15,6 (2)

In Klammern: Zahl der Versuche.

filtrats, die Menge der filtrierten Glucose niedriger als bei den normalen Kaninchen liegt, sind auch im allgemeinen niedrigere *Tm*-Werte zu

Tabelle 5. *Berechnete und gefundene Werte für die tubuläre Zuckerrückresorption*

	Filtrierte Glucose mg/kg/min	Gefundene *Tm* mg/kg/min	Berechnete *Tm* mg/kg/min
Kontrolle (26)	32,6	13,5	14,0
24—72 Std nach 1 mg/kg Aristolochiasäure i.v. (16)	20,2	6,31	6,40

In Klammern: Zahl der Versuche.

erwarten. Bei gleichem Glucosefiltrat zeigen aber, wie es aus Tab. 4 hervorgeht, auch die vergifteten Tiere die gleiche Resorptionsfähigkeit, wie die Normaltiere. Auch die experimentell gefundenen und theoretisch berechneten *Tm*-Werte stimmen bei den vergifteten Tieren miteinander ebenso gut überein, wie bei den Normaltieren (Tab. 5), *was eindeutig für das Intaktbleiben der Glucoseresorption nach Aristolochiasaure-Vergiftung zu sprechen scheint.*

6. Fermentaktivitätsänderungen. Mehrere histologische Befunde liegen darüber vor, daß die alkalische Phosphataseaktivität des Nierengewebes sich hauptsächlich auf den Bürstensaum der Kanälchen erster Ordnung lokalisiert (Baur). So schien es uns angebracht, auch eine direkte quantitative Untersuchung durchzuführen, inwieweit diese Fermentaktivität sich in der Niere nach Vergiftung mit Aristolochiasäure

verändert. Wie es Tab. 6 zeigt, ist die alkalische Phosphataseaktivität in Nierenhomogenaten von vergifteten Kaninchen stark abgenommen, während die saure Phosphataseaktivität keine signifikante Abweichung

Tabelle 6. *Enzymaktivitätsänderungen in der Kaninchenniere nach Vergiftung mit 1 mg/kg Aristolochiasäure*

Enzyme	Kontrolle	48	96	120
		Stunden nach Vergiftung		
Alkalische Phosphatase (mg P/g Trockengewicht/Stunde)	$38{,}6 \pm 0{,}9$ (5)	$17{,}5 \pm 2{,}0$ (3) $-54{,}8\%$ $P < 0{,}02$	$15{,}6 \pm 1{,}3$ (7) $-59{,}6\%$ $P < 0{,}001$	$15{,}9 \pm 2{,}8$ (4) $-58{,}7\%$ $P < 0{,}001$
Saure Phosphatase (mg P/g Trockengewicht/Stunde)	$6{,}7 \pm 0{,}3$ (5)	$8{,}1 \pm 1{,}2$ (3) $+20{,}9\%$ $P > 0{,}20$	$8{,}2 \pm 0{,}7$ (7) $+22{,}5\%$ $P > 0{,}20$	$6{,}15 \pm 1{,}3$ (4) $-8{,}2\%$ $P > 0{,}50$
Bernsteinsäuredehydrogenase (mg Formazan/g Trockengewicht/Stunde)	$36{,}2 \pm 3{,}9$ (6)	$13{,}4 \pm 3{,}0$ (3) $-62{,}9\%$ $P < 0{,}01$	$7{,}71 \pm 0{,}42$ (6) $-78{,}6\%$ $P < 0{,}001$	$8{,}75 \pm 2{,}0$ (4) $-75{,}6\%$ $P < 0{,}001$

In Klammern: Zahl der Tiere.

von Normaltieren zeigt. Dagegen wird die Bernsteinsäuredehydrogenaseaktivität im Laufe der Vergiftung wesentlich abgenommen.

Besprechung der Ergebnisse

Die ersten ausführlichen pharmakologischen Untersuchungen über *Aristolochia clematitis* wurden von Pohl durchgeführt. Er hat aus der Pflanze einen Stoff mit der Bruttoformel $C_{32}H_{22}N_2O_{13}$ isoliert. Dieser Stoff wurde als „Aristolochin" bezeichnet. Nach seinen Untersuchungen rief Aristolochin an Kaninchen und Hunden qualitativ im wesentlichen dieselben Veränderungen hervor, welche wir in unseren Versuchen der Aristolochiasäure zugeschrieben haben. In Pohls Versuchen konnte keine so selektive Schädigung in den Nieren nachgewiesen werden, welche wir beobachtet haben, obwohl auch er betont, daß die Nierenschädigung sich hauptsächlich auf die „Cortex corticalis" beschränkt. Pohl mußte relativ große Dosen von Aristolochin (7—10 mg/kg) verwenden, um eine nierenschädigende Wirkung bei den Kaninchen auslösen zu können. Wir selbst haben schon die Gabe von 1 mg/kg Aristolochiasäure als LD_{100} gefunden; und wenn man die Abweichungen in Bruttoformeln von Aristolochin und Aristolochiasäure vor Augen hält, scheint es sehr wahrscheinlich, daß Pohls Stoff vielleicht nicht einheitlich war. Daran gibt es aber kein Zweifel, daß Polhs Aristolochin auch Aristolochiasäure enthielt, obwohl er den sauren Charakter bzw. das Vorhandensein einer Carboxylgruppe in seinem Präparat für unwahrscheinlich hielt.

Außer Pohls Versuchen aus dem Jahre 1892, haben wir keine Angaben über eine pharmakologische Prüfung von Osterluzei gefunden. In chemischer Hinsicht beschäftigten sich mehrere Verfasser mit den *Aristolochia*-Arten. So beschrieb Hesse schon in 1896 fünf Stoffe von *Aristolochia argetina*, mitunter auch die Aristolochiasäure. Neuere Ergebnisse wurden von Rosemund u. Reichstein bzw.

von Pailer u. Mitarb. geliefert. Rosemund u. Reichstein isolierten die Aristolochiasäure im Jahre 1943 in chemisch reiner Form und fanden für ihre Bruttoformel $C_{17}H_{11}O_7N$. Die Bruttoformel, sowie der Schmelzpunkt der Verbindung stimmt mit den von uns gefundenen bzw. mit den von Pailer u. Mitarb. gegebenen Werten völlig überein. Die chemische Struktur wurde nur von dem letztgenannten Autoren untersucht: nach ihnen ist die in der Einleitung gegebene Struktur die wahrscheinlichste. Angaben über eine Synthese von Aristolochiasäure liegen unserem Wissen nach nicht vor.

Aus den Ergebnissen, die wir im Laufe der funktionellen Untersuchungen über Nierentätigkeit der mit Aristolochiasäure vergifteten Kaninchen erhalten haben, sollen zwei zentrale Fragen hervorgehoben werden. Die erste Frage lautet: inwieweit entsprechen diese Ergebnisse denjenigen Funktionsveränderungen, welche wir auf Grund unserer bisherigen nierenphysiologischen Kenntnisse erwarten könnten.

Die Abnahme des Glomerulusfiltrats ist auf dem Grund der hochgradigen Rindenischämie vorauszusehen. Ebenso kann die totale Aufhebung der PAH — und Phenolrotausscheidung nach Zerstörung der proximalen Kanälchenzellen vorausgesagt werden. Auch die Abnahme der alkalischen Phosphataktivität ist zu erwarten, da dieses Ferment sich hauptsächlich auf die proximalen Teile des Kanälchensystems lokalisiert (Baur). Das Fehlen irgend einer signifikanten Änderung in saurer Phosphataseaktivität spricht dafür, daß dieses Ferment sich nicht so überwiegend in den Kanälchen I. Ordnung, wie die alkalische Phosphatase befindet.

Auch die Aktivitätsverminderung der Bernsteinsäuredehydrogenase ist zu erwarten, da bestimmte histologische Angaben für eine bevorzugte Lokalisierung dieses Ferments in den proximalen Kanälchen sprechen (Mustakallio u. Telkkä).

Die andere Frage, die hier besprochen werden soll, nämlich jene der unerwarteten Befunde, scheint schon verwickelter zu sein. Ein solcher Befund war das relative gute Erhaltenbleiben der Diurese, die anfänglich, trotz der extremen Rindenischämie, sogar zunahm. Eine Erklärung dafür ist nur in einer Abnahme der tubulären Wasserrückresorption zu suchen. Der vollständige Ausfall der fakultativen Wasserresorption deutet schon an sich selbst darauf hin, daß es nach Zerstörung der Kanälchen I. Ordnung eine Störung in dem, auf ADH reagierenden Kanälchensystemen auftritt. Diese Behauptung wird durch das völlige Ausbleiben der Glanduitrinwirkung in vergifteten Tieren stark unterstützt. Es liegt nahe, daran zu denken, daß der Ausfall der Hormonfunktion darauf zurückzuführen sei, daß diejenigen anatomischen Gebilde durch die Aristolochiasäure geschädigt werden, die für diese Funktion verantwortlich sind. Doch fanden wir keine morphologisch nachweisbare Veränderungen an jenem Abschnitt des tubulären Systems, wo der allgemeinen Meinung nach, der Angriffspunkt des ADH liegt (Burgess; Smith;

Shannon; Pitts u. Sartorius; Spühler; Pickford). Da aber eine funktionelle Störung auch ohne morphologisch nachweisbare Veränderungen zustande kommen kann, kann man sich vorstellen, daß die Aristolochiasäure vielleicht auch an den distalen Kanälchenteilen eine Funktionsstörung hervorruft. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, daß das Ausbleiben der antidiuretischen Hormonwirkung eine Folge der funktionell-strukturellen Schädigungen des Hauptstückes sei. Diese Frage wurde ausführlich an anderer Stelle besprochen (Decsi, Méhes u. Varga).

Sehr überraschend war auch die Beobachtung, daß Zucker im Harn auch nach Zerstörung der Zellen der Tubuli I. Ordnung nicht erscheint. Mit dieser Frage haben wir uns sehr eingehend beschäftigt und auf Grund dieser Untersuchungen sollte der Schluß gezogen werden, daß die Niere eines mit Aristolochiasäure vergifteten Kaninchens zur gleichen Glucoseresorption fähig ist, als jene eines gesunden Kaninchens. Natürlich kann man sich auch vorstellen, daß ein, im Laufe der Vergiftung vielleicht intakt bleibender Bruchteil der proximalen Kanälchenzellen die Glucose resorbiert. Dies scheint aber aus quantitativen Gründen nicht sehr wahrscheinlich, besonders, wenn man bedenkt, daß die PAH- und Phenolrotausscheidung völlig aufgehoben wird, als ein Zeichen dafür, daß praktisch sämtliche Zellen der proximalen Kanälchen im Laufe der Vergiftung zugrunde gegangen sind.

In diesem Zusammenhang soll auch die Möglichkeit besprochen werden, inwieweit mit einer passiven Rediffusion von Glucose durch das geschädigte Epithel zu rechnen sei. Daß die Glucose nicht passiv rediffundiert, kann durch die folgenden Beobachtungen bewiesen werden. Die erste ist die Wirkung des Phloridzins: wie schon erwähnt, führt Phloridzin bei den vergifteten Tieren ebenso zu einer Glykosurie, wie bei den normalen Kaninchen. Eine passive Rediffusion könnte natürlich durch Phloridzin nicht beeinflußt werden. Die zweite Beobachtung ist, daß die *Tm-Glucose* mit Hilfe der, an Normaltieren ermittelten Regelmäßigkeit bzw. Gleichung auch bei den vergifteten Tieren ebenso genau berechnet und vorausgesagt werden kann, wie bei den Normaltieren. Dies schließt die etwaige Mitwirkung eines neuen Faktors (hier: die passive Rediffusion) schon an sich allein aus.

Es scheint also als ob die Zuckerresorption bei den Kaninchen praktisch ohne Teilnahme der proximalen Kanälchenzellen ablaufen könne. So ist es anzunehmen, daß es in der Kaninchenniere nicht nur das Hauptstück, sondern auch andere Nierenteile, wie z. B. der distale Teil der Pars recta medullaris zu einer aktiven Glucoseresorption fähig sind.

Für die Zuckerresorption scheint auch die alkalische Phosphataseaktivität des Nierengewebes nicht völlig erhalten werden zu sollen: 40%

der Fermentaktivität, welche in den Nieren auch nach Aristolochiasäure-Vergiftung zurückbleiben, scheinen für eine ungestörte Zuckerresorption vollkommen zu genügen.

Die äußerst toxische Wirkung der Aristolochiasäure, die aber selektiv auf die Zellen der gewundenen Kanälchen I. Ordnung der Kaninchenniere ausgeübt wird, wirft natürlich noch viele zu beantwortende Fragen auf. Sehr interessant ist, daß die Aristolochiasäure bei den Hunden niemals eine Nierenschädigung, dagegen eine hochgradige Darmentzündung auslöst. An Katzen, Fröschen und Meerschweinchen ist sie wirkungslos, an Mäusen und Ratten kaum wirksam. Diese relative Unwirksamkeit an anderen Tierarten, im Vergleich zu den Kaninchen, bzw. die Darmentzündung auslösende Wirkung an Hunden kann nur so erklärt werden, daß eine Umwandlung des Stoffes im Organismus angenommen wird. Ist es vielleicht das Kaninchen, dessen Organismus die Aristolochiasäure in eine spezifisch wirkende toxische Verbindung zu umwandeln fähig ist, oder andere Tierarten verfügen über einen Detoxikationsmechanismus, welcher die Aristolochiasäure in ihrem Organismus entgiftet und welcher den Kaninchen fehlt; in dieser Frage können wir zur Zeit noch keinen endgültigen Standpunkt vertreten.

Zusammenfassung

Aristolochiasäure ruft bei den Kaninchen eine selektive Nekrose der Epithelzellen in den proximalen gewundenen Nierenkanälchen und eine Nierenrindenischämie hervor, während sie die anderen Teile des Kanälchensystems und die Glomeruli intakt läßt. Untersuchungen über die Nierentätigkeit solcher Tiere ergaben, daß die p-Aminohippursäure- und Phenolrotausscheidung nach isolierter Zerstörung der Kanälchen I. Ordnung völlig eingestellt wird. Die Tiere können nur 80% des in den Glomeruli filtrierten Wassers zurückresorbieren. Die Wirkung des exogenen antidiuretischen Hormons wird völlig aufgehoben. Die alkalische Phosphataseaktivität, sowie die Bernsteinsäuredehydrogenaseaktivität nehmen stark ab, während die saure Phosphataseaktivität sich nicht verändert. Die tubuläre Zuckerresorptionsfähigkeit ist völlig erhalten.

Literatur

Baur, H.: Ztschr. VI. HO. FE. **2**, 507 (1949).
Brod, J., and J. H. Sirota: Amer. J. Physiol. **157**, 31 (1949).
Burgess, W. W., A. M. Harvey and E. K. Marshall: J. Pharmacol. exp. Ther. **49**, 237 (1933).
Decsi, L.: Acta physiol. Acad. Sci. hung. **13**, 255 (1958).
Decsi, L., J. Méhes and F. Varga: Acta physiol. Acad. Sci. hung. **13**, 21 (1958).
Fiske, C. H., and J. Subbarow: J. biol. Chem. **66**, 375 (1925).
Folin, O., and R. D. Bell: J. biol. Chem. **29**, 379 (1917).
Forster, R. P.: Amer. J. Physiol. **168**, 666 (1952).
Gömöri, G.: J. cell. comp. Physiol. **17**, 71 (1941).
Hesse, O.: Arch. Pharm. **233**, 684; zit. in Berichte d. deutschen Chem. Ges. **29**, 38 (1896).
Horii, J., u. Y. Tomikawa: zit nach H. Baur: Ztschr. VI. HO. FE. **2**, 507 (1949).
Kedvessy, G.: Magyar Gyógyszerésztudományi Értesitő **21**, 31 (1947).

Klupp, H., u. B. Watschinger: Arch. int. Pharmacodyn. **82**, 297 (1950).
Kóssa, J.: Beitr. path. Anat. u. allgem. Path. **54**, 373 (1901).
Kun, E., and L. G. Abood: Science **109**, 144 (1949).
Láng, S.: Kisérletes Orvostudomány **4**, 386 (1952).
Martinčič, A.: Zbl. allg. Path. path. Anat. **94**, 402 (1956).
Méhes, J., L. Decsi, S. Kovács, F. Varga u. J. Szőke: Acta Physiol. Acad. Sci. hung. **6**, Suppl. 53 (1954).
Miller, B. F., A. S. Alving and J. Rubin: J. clin. Invest. **19**, 89 (1940).
Mustakallio, K. K., and A. Telkkä: Ann. med. exp. Fenn. **32**, 123 (1954).
Nelson, N.: J. biol. Chem. **153**, 375 (1944).
Pailer, M., L. Belohlav u. E. Simonitsch: Mh. Chem. (Wien) **87**, 249 (1956).
Pickford, M.: Pharmacol. Rev. **4**, 254 (1952).
Pitts, R. F., and O. W. Sartorius: Pharmacol. Rev. **2**, 161 (1950).
Pohl, J.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **29**, 282 (1892).
Popper, H., E. Mandel u. H. Mayer: Biochem. Z. **291**, 354 (1937).
Rosemund, H., u. T. Reichstein: Pharm. Acta Helv. **18**, 243 (1943).
Rusznyák, St.: Biochem. Z. **114**, 25 (1921).
Shannon, J. A.: J. exper. Med. **76**, 371 (1942).
Sheehan, H. L.: J. Physiol. **72**, 201 (1931).
Smith, H. W.: Physiology of the Kidney. Oxford Univ. Press 1937.
Spühler, O.: Zur Physio-Pathologie der Niere. Med. Verlag Hans Huber, Bern 1946.

Prof. Dr. Julius Méhes,
Pharmakol. Inst. d. Med. Univ. Pécs (Ungarn), Rákóczi u. 2

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, S. 566 (1958)

Chemisches Institut (Direktor: Prof. Dr. L. Cholnoky) und Pharmakologisches Institut (Direktor: Prof. Dr. J. Méhes) der Medizinischen Universität, Pécs (Ungarn)

Kurze Mitteilung

Isolierung und Reindarstellung der Aristolochiasäure

Von

Gy. Schneider, J. Szőke und S. Kovács

(Eingegangen am 28. August 1958)

Im Herbst gesammelte und gereinigte Aristolochia clematitis-Wurzeln werden bei 60° im Vakuum getrocknet, dann fein gepulvert. Das Pulver wird mit kaltem Petroläther entfettet und mittels kochendem Benzin chlorophyllfrei gemacht. Nach Entfettung wird die Droge mit heißem Äthanol extrahiert, bis der Alkohol farblos wird. Dann wird die Extraktion mit 1%NaOH-haltigem Alkohol beendet. Beide Extrakte werden vereinigt und bei 50° im Vakuum eingedampft. Eine braune, leicht bewegliche ölige Substanz bleibt zurück, die in 1%iger NaOH gelöst und dann mit 1%iger H_2SO_4 angesäuert wird. Ein braungelber Niederschlag fiel aus, den wir zentrifugierten und mit Wasser so lange wuschen, bis das Spülwasser keine SO_4-Reaktion zeigte; nachher wurde er bei Zimmertemperatur über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Es bleibt ein bräunliches Pulver zurück, welches einen äußerst bitteren Geschmack besitzt. Die so erhaltene rohe Aristolochiasäure wird im Soxhlet-Apparat mit Petroläther extrahiert, solange das Lösungsmittel noch eine grünlichbraune Farbe zeigt. Dann wird die Extraktion mit Äther fortgesetzt. Nach mehrtägiger Extraktion schied sich im Äther die gelbe Aristolochiasäure aus. Diese wird in Dioxan gelöst, mit Tierkohle geklärt und kristallisiert. Nach mehrmaliger Klärung und Umkristallisierung erhielt man die Aristolochiasäure als orangegelbe Kristalltafeln.

Die aus Dioxan umkristallisierte Aristolochiasäure gab bei der Analyse keine gut reproduzierbaren einheitlichen C- und H-Werte, da die Verbindung mit mehreren Lösungsmitteln so auch mit Dioxan, einen Komplex bildet. Über die Komplexe der Aristolochiasäure sowie über verschiedene Derivate derselben soll in einer späteren Arbeit berichtet werden.

Die Aristolochiasäure wurde in der folgenden Weise für Analyse vorbereitet: nach Umkristallisierung aus Dioxan wurde die Aristolochiasäure in 1%iger NaOH gelöst, mit 1%iger H_2SO_4 ausgefällt und abfiltriert. Dann wurde von SO_4 frei gewaschen, über P_2O_5 bei Zimmertemperatur getrocknet, und aus n-Butanol umkristallisiert. Die reine Aristolochiasäure wird in gelbe Kristallnadeln erhalten. Wir trockneten die Substanz bei 100° im Vakuum.

Die Aristolochiasäure bräunt sich bei 275° und zersetzte sich bei 282 bis 285°. (Schmelzpunktbestimmung nach der Mikromethode von A. Koffler.)

$C_{17}H_{11}O_7N$ Berechnet: C 59,82, H 3,25, N 4,11
Gefunden: C 59,94, H 3,42, N 4,17

Dr. Gy. Schneider, Chemisches Institut d. Medizinischen Universität, Pécs (Ungarn)